



Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-
UAM)
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

LA PROTEÍNA MAL COMO COMPONENTE DE LA MAQUINARIA DE TRANSPORTE ESPECIALIZADO EN EL LINFOCITO T

Memoria Presentada por la Licenciada

Olga María Antón Hurtado

para optar al grado de Doctor en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis
Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero

Madrid, Octubre de 2009

Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Alonso Lebrero, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Cantoblanco, Madrid), con una beca predoctoral para la formación del personal universitario financiada por el Ministerio de Educación. Parte del trabajo presentado fue llevado a cabo en el laboratorio de la Dra. Rosa Puertollano Moro, en el National Heart, Lung and Blood Institute (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

**A mis padres, Jose y Maribel,
que siempre son un referente para mí.**

**A Javi,
que camina pacientemente a mi lado**

***Solo triunfa en el mundo quien se levanta y busca a las circunstancias,
creándolas si no las encuentra.***

George Bernard Shaw
(1856-1950)

AGRADECIMIENTOS

Cada etapa de la vida tiene un comienzo y un fin; los humanos solemos recordar estos dos momentos, pero lo realmente bonito es recordar lo acontecido "durante". Lejos ha quedado aquel primer día en el laboratorio c-210 de Biológicas, cuando comencé esta aventura científica. Desde ese momento, muchas personas han estado a mi lado y quiero dedicarles el espacio que se merecen en esta tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a **Miguel** el brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, el haber confiado en mí y haberme enseñado todo cuanto sé de la ciencia: haber aprendido un poco de cuanto sabes ya sería un logro. Gracias por dirigirme esta tesis, aguantando mis interminables "rollos", y por dejarme la libertad justa para desarrollarme científicamente sin dejar que me perdiera. Gracias por permitirme formar parte de la familia MAL.

A mis compañeros: en primer lugar, a **Laura**, tan distinta a mí y tan necesaria. ¡Cuántos momentos me has sostenido! Tantas cosas, que si empezara, no terminaría, así que lo resumo: gracias por todo. Gracias, **Juanfra**, por ser un auténtico hermano mayor, científica y personalmente. A **Alberto**, por toda tu ayuda científica, pero sobre todo, por escucharme siempre. Te considero un muy buen amigo. A **Juanan**, tan grande en tu sencillez. Cuántas risas cuando las necesitaba... A **Leandro**; me encanta tu modo de ver la vida, siempre optimista, no cambies. A **Natalia**, por tu dulzura y tu valentía. Eres un ejemplo para mí. A todos los "pequeñajos": a **Alejo**, tan peculiar, a **Manu**, me encanta hablar contigo, a **Arancha**, siempre alegre, a **Bea**, un ejemplo de dedicación. A todos los "mayores": a **Ricardo**, dialéctica y sarcasmo, mi mente ha permanecido cuerda gracias a ti, a **Jaime**, un apasionado de la ciencia, ilo contagias, chavall!, a **Fernando**, un ejemplo de trabajador incansable, un referente, y a **Silvia**, me ayudaste mucho cuando estuve fuera, ahora me toca a mí corresponder. No quiero olvidarme de **Maica**. Poco coincidimos juntas, pero dejaste huella en mí. Ojalá hubiera más personas como tú. También quiero agradecer a **Alicia** todo cuanto me enseñó, de la ciencia y de la vida, sabiendo saborear cada momento.

A **Isabel**, quiero agradecerle que accediera a ser mi tutora y que aliente mi motivación para superarme día a día. A **Ana**, siempre concentrada en la 4.1., un ejemplo de trabajo duro. A **Laura**, con una sonrisa siempre en la cara. A **Altea**, tan paciente y tan generosa.

Traspassando las barreras del "labo", hay mucha gente muy especial para mí: gracias a **Claudia**, tan preocupada siempre por los demás, referente de la ciencia bien hecha, a **Bea**, siempre atenta a las necesidades de la gente, trabajadora

incansable, a **Irene**, ¡qué bien me haces sentir! Eres una de esas personas que te calan en el corazón, a **Araceli**, "clonaje woman", me encanta tu forma de ver la vida, gracias por escuchar. A **Patri**, **Carlos**, **Enma**, **Elisa**, **Elise**, **Yago**, **Tamara**, **Kathy**, **Mila**, **Alain**, **Nacho**, **Ana**, **Inma**, **Laura**, **Beatriz**, **Bárbara** y **Elena**, por vuestra ayuda y por compartir tantos momentos, bueno, y por dejarme asaltar vuestros dulces. A **Jimena** y **Nadia**, por escucharme. A **Elena**, **Juanjo**, **Horacio**, **Patricia** y **Begoña**, por permitirme compartir con vosotros el mismo momento que me encantaría que compartáis vosotros conmigo. A **Quique**, un gran fan del show de los viernes por la tarde, gracias por escucharme. A **David**, un reciente descubrimiento, gracias por tus ánimos. A **José**, fuiste y sigues siendo un amigo.

A los chicos del 222, en especial a **Patri**, que habla tanto como yo, pero escucha mucho más, a **Juan**, siempre dispuesto a alegrarme, a **Sara** y **Quique**, los próximos en pasar por esto, a **Marina**, siempre trabajando duro y a **Chus**, la experta en las "maquinitas".

Mucha es la gente del centro que no puedo dejar de mencionar: en primer lugar a la gente de microscopía: a **Carlos**, aún me asombran la cantidad de cosas que caben en tu cabeza, ¡cuántos consejos me has dado! A "los Ángeles de Charlie": **Vero**, un ejemplo de fortaleza (aunque tú digas que no), **Maite**, siempre dispuesta a escuchar, y **Mari Ángeles**, siempre dispuesta a ayudar. No sé qué habría hecho yo sin vosotras.... No quiero olvidarme de **Berta**, que pacientemente me ha enseñado todo lo que sé de citometría.

También quiero agradecer a **Rosa** el haberme acogido en su laboratorio; aprendí mucho de tí. A **Claudia** y **José**, por hacerme la estancia en Washington muy fácil.

Fuera de este mundillo hay muchas personas que se han ganado un GRACIAS enorme: **Lucía**, amiga incansable, en lo bueno y en lo malo, **Ricardo**, tan transparente que no caben malos sentimientos en ti, **María G.**, ¡cuánto me has escuchado!, **María I.**, generosidad y dulzura todo en uno, **Alfredo**, sinceridad, **Alfonsito**, espontaneidad y vitalidad, y **Charo**, un cuarto de siglo de amistad lo resume todo. También quiero agradecer a otros amigos "consortes": a **Carlos**, mirar la vida a través de tus ojos es muy enriquecedor, a **Jorge** y **Patri**, con más gente como vosotros, este mundo funcionaría mucho mejor, a **María**, **Guti**, **Amparo**, **Revi**, **David**, **Ramón**, **Nico** y **Sergio**, que desde el primer momento me han hecho sentir parte de su mundo.

También quiero agradecer a mi "otra familia" , **Javier**, **Blanca**, **Rafa** y **Miguel**, el haberme acogido tan bien, el hacerme sentir siempre como en casa y el haberme inyectado fuerzas para continuar cuando las he necesitado. No me olvido

de **"la yaya"**, pura energía; un terremoto de vitalidad que me enseña a disfrutar de la vida día a día.

Muchas gracias a toda mi familia, que siempre se han interesado por el estado de esta tesis. Sé que no ha sido algo fácil de entender, pero siempre habéis mostrado tanto interés en ello que me ha hecho sentir vuestro apoyo. Muchas gracias a mis tíos, **Celia, Luis, Mario, Montse, Isidro y Manoli** (no importa el orden) y a mis primos **María, Paula, Laura, José Luis y Elena**, iqué a gusto me siento entre vosotros siempre!. Gracias a mi familia malagueña, **Tina, Yoli, Pepe y Lidia**, porque, a pesar de la distancia, siempre os he sentido cerca. No me olvido de la abuelas, **Tere e Isabel**. Gracias por quererme tanto. Y gracias también a mis abuelos, **Isidro y Mario**, con quienes camino sin el obstáculo del tiempo.

Dejo un lugar especial para mis padres, **Jose y Maribel**. En primer lugar, gracias por darme la vida, por educarme y por transmitirme unos valores. Eso es lo máspreciado que tengo en el mundo, y gran parte de lo que soy, os lo debo a vosotros. Gracias por apoyarme siempre en esta locura. Gracias por acompañarme tantas tardes de domingo al laboratorio; habéis contribuido a esta tesis más de lo que pensáis. Me siento superorgullosa de vosotros, espero poder haceros sentir igual. Gracias también a **Gala**, tan pequeña para el mundo y tan grande para mi corazón.

Por último, te he dejado a ti, **Javi**. ¿Cómo agradecerte TODO? Caminar a tu lado es sencillo, tú lo haces sencillo. Me aportas tanta tranquilidad... ¡Cuántos momentos me has sostenido, cuántos me has impulsado! Me inyectas adrenalina para superarme día a día, para intentar ser tan buena científica como lo eres tú. Te admiro tanto... Esta tesis es tuya también.

Todos los que aparecéis aquí habéis contribuido a que este proyecto llegue a su fin. Me habéis dado mucho, espero poder corresponderos como cada uno os merecéis:

¡GRACIAS A TODOS!

SUMMARY

T lymphocytes are specialized cells that can be activated in response to an specific antigen presented by an APC. The formation of the IS is a regulated process that involves the orderly, spatial-temporal, polarized redistribution of receptors, intracellular-signaling molecules and cytoskeletal proteins. Little is known about traffic processes which lead to the formation of the characteristic structure of the IS, but the result is a highly ordered pattern which involves aggregation and segregation of proteins and lipids. The formed structure, as leads to T cell activation, is known as supramolecular activation complex (SMAC).

The MAL protein is a highly hydrophobic integral membrane protein consisting of four hydrophobic segments separated by short hydrophilic loops, that has been proposed as an essential component of the specialized machinery for apical targeting in epithelial cells. Its function is to reclute cargo proteins, as HA, and deliver them to the apical surface of MDCK cells (Puertollano et al., 1999). MAL protein is exclusively found in membranes rafts fractions in all the cell types in which is expressed. MAL cDNA is also expressed in Jurkat and primary T cells (Alonso and Weissman, 1987), but the role of the protein in these cells has remained elusive.

The generation of a Jurkat cells mutants deficient in TCR signalling in combination with the use of siRNA silencing techniques have been invaluable strategies for dissecting the T-cell signalling machinery. Here we used a TCR-signalling- defective mutant, named JTIM, that lacks MAL expression to investigate the role of MAL in T cells. JTIM cells was described as defective in the formation of a normal IS and induction of IL-2 production (Anton et al., 2008). One of the defects observed comparing Jurkat normal cells and JTIM cells was that the src kinase Lck was unusually concentrated in the intracellular compartment in JTIM mutant. The abnormal distribution of Lck in JTIM cells lead us to think in a possible role of MAL in regulating Lck targeting to the plasma membrane. We show that Lck travels to the plasma membrane in specific transport carriers containing MAL. Coimmunoprecipitation experiments, indicated an association of MAL and Lck. This association seemed to facilitate the incorporation of Lck to lipid rafts. The forced expression of Lck at the plasma membrane in JTIM cells got partial correction of the latter defects observed in JTIM cells, but the complete correction only took place with the exogenous expression of MAL. During the formation of the IS, a pool of MAL rapidly relocates at the center of the contact (cSMAC). This localization seems to be dependent of the integrity of the last hydrophilic loop, as its disruption results in the missorting of the modified MAL molecule to the pSMAC. The presence the MAL at the pSMAC alters the SMAC in such a manner that Lck and LAT, both of them raft-associated proteins, and the GM1 ganglioside which are normally distributed at the cSMAC, were mistargeted to the pSMAC. Moreover, ectopically-expressed HA was targeted to either the cSMAC or the pSMAC depending on the expression of intact or modified MAL, respectively.

Based on these observations, we propose a MAL as an essential component of an specialized transport machinery in T cells and as a regulator of the membrane microdomains integrity, which are involved in several processes such as the SMAC formation.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|------------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| APC | Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell) |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARN_i | ARN de interferencia |
| shARN | ARN pequeño en horquilla (Short Hairpin ARN) |
| BCR | Receptor para el antígeno de células B (B Cell Receptor) |
| BSA | Albumina de Suero Bovina (Bovine Serum Albumin) |
| CMTMR | 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine |
| cSMAC | SMAC central (central SMAC) |
| DIGs | Membranas insolubles en detergente enriquecidas en glicosfingolípidos (Detergent-Insoluble Glycophosphatidylinositol enriched membranes) |
| DRMs | Membranas resistentes a detergente (Detergent Resistant Membranes) |
| FRET | Técnica de fluorescencia por transferencia de energía por resonancia (Fluorescence Resonance Energy Transfer) |
| GEMs | Membranas enriquecidas en glicolípidos (Glycolipid-Enriched Membranes) |
| GFP | Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein) |
| GPI | Glicosil fosfatidil-inositol (GlycosylPhosphatidyInositol) |
| h | Horas |
| HA | Hemaglutinina (HemAgglutinin) |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 (InterCellular adhesión Molecule-1) |
| ICAM-3 | Molécula de adhesión intercelular-3 (InterCellular adhesión Molecule-3) |
| IS | Sinapsis Inmunológica (Immunological Synapse) |
| ITAM | Motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif) |
| JTIM | Mutante de células Jurkat deficiente en la señalización inducida por el TCR (Jurkat TCR-signalling impaired mutant) |
| LAT | Proteína adaptadora de la activación de linfocitos T (Linker of Activation of T cells) |
| LFA-1 | Antígeno asociado a la función de los linfocitos T-1 |
| MAPK | Proteína quinasa de la activación mitogénica (Mitogen-Activated Protein Kinase) |
| MDCK | Células epiteliales renales caninas (Madin-Darby kidney cells) |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex) |
| min | Minutos |
| MTOC | Centro organizados de microtúbulos (MicroTubule Organizing Center) |
| NF-AT | Factor nuclear de células T activadas (Nuclear Factor of Activation of T cells) |
| NF-κB | Factor nuclear de activación kappaB (Nuclear Factor κB) |
| PBLs | Linfocitos de sangre periférica (Peripheral Blood Lymphocytes) |

| | |
|--------------------------------|--|
| PBS | Tampón fosfato (Phosphate Buffered Saline) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) |
| PKC | Proteína quinasa C (Protein Kinase C) |
| PLC-γ | Fosfolipasa C-γ (PhosphoLipase C- γ) |
| PMA | Phorbol 12-Myristate 13-Acetate |
| PMSF | Phenyl Methane Sulphonyl Fluoride |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| pSMAC | SMAC periférico (peripheral SMAC) |
| SEB | Superantígeno bacteriano B |
| SEE | Superantígeno bacteriano E |
| SH2 | Dominio de homología Src-2 (Src Homology 2) |
| SH3 | Dominio de homología Src-3 (Src Homology 3) |
| SMAC | Complejo supramolecular de activación (Supramolecular Activation Complex) |
| TCR | Receptor para el antígeno de célula T (T Cell Receptor) |
| TfR | Receptor de Transferrina (Transferrin Receptor) |
| TX-100 | Tritón X-100 (Triton X-100) |

INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 1. El linfocito T como células efectora del sistema inmunitario | |
| 1.1 Los linfocitos T..... | 3 |
| 1.2 Presentación y reconocimiento de antígeno..... | 3 |
| 1.3 La sinapsis inmunitaria..... | 5 |
| 1.4 La hipótesis de los microclusters..... | 7 |
| 1.5 Función de la sinapsis inmunitaria..... | 9 |
| 1.6 Rutas de activación..... | 9 |
| 1.7 Transporte vesicular en linfocitos T..... | 11 |
| 1.8 Estructura, función y transporte de la proteína Lck..... | 13 |
| 2. Las balsas de membrana | |
| 2.1 Estructura de las balsas de membrana | 15 |
| 2.2 Aislamiento de las balsas de membrana. Controversia sobre su existencia | 16 |
| 2.3 Maquinaria proteica de las balsas de membrana | 17 |
| 2.4 Las balsas de membrana y la activación del linfocito T..... | 17 |
| 3. La familia MAL de proteínas | |
| 3.1 La proteína MAL..... | 19 |
| 3.2 Función de la proteína MAL en la células epiteliales polarizadas..... | 19 |
| 3.3 MAL en linfocitos T..... | 21 |
| 4. La línea celular Jurkat como modelo de linfocitos T | |
| 4.1 La línea celular Jurkat y sus mutantes..... | 21 |
| 4.2 Caracterización de un mutante de células jurkat deficiente en la expresión de MAL..... | 22 |

OBJETIVOS

| | |
|--|----|
| 1. Objetivos del trabajo de investigación | 27 |
|--|----|

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 1. Materiales | |
| 1.1 Líneas celulares y células primarias..... | 31 |
| 1.2 Anticuerpos..... | 31 |
| 1.3 Reactivos..... | 33 |
| 1.4 Plásmidos y oligonucleótidos..... | 33 |
| 2. Métodos | |
| 2.1 Cultivos celulares..... | 35 |
| 2.2 Experimentos de conjugación..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Análisis por microscopía de fluorescencia..... | 36 |
| 2.4 Videomicroscopía..... | 36 |
| 2.5 Transfección..... | 37 |
| 2.6 Análisis por citometría de flujo..... | 37 |
| 2.7 Aislamiento de membranas insolubles en detergente..... | 38 |
| 2.8 Electroforesis e inmunotransferencia..... | 38 |
| 2.9 Inmunoprecipitación..... | 39 |
| 2.10 Experimentos de pulso y caza..... | 40 |
| 2.10 Aislamiento y transfección de linfocitos de sangre periférica (PBLs) | 40 |

RESULTADOS

| | |
|---|----|
| 1. La proteína MAL es necesaria para la formación de la SI..... | 45 |
| 2. La proteína MAL es necesaria para el transporte de la tirosina-quinasa Lck a la membrana plasmática..... | 46 |
| 3. La proteína MAL es necesaria para la incorporación de Lck en membranas insolubles..... | 48 |
| 4. MAL se asocia con Lck..... | 49 |
| 5. La expresión forzada de Lck en la membrana en las células JTIM rescata algunos de los defectos en la formación de la SI..... | 50 |
| 6. La proteína MAL y la quinasa Lck viajan en las mismas vesículas hacia la membrana plasmática..... | 52 |
| 7. La expresión de MAL es necesaria para la formación de las vesículas que transportan Lck a la membrana plasmática..... | 54 |
| 8. La proteína MAL es necesaria para el reclutamiento de LAT a la SI pero no es necesaria para su transporte a membrana..... | 56 |
| 9. La proteína MAL se concentra en la SI..... | 59 |
| 10. Caracterización de los clones de células Jurkat establemente transfectados con las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG..... | 51 |
| 11. MAL se concentra en la zona central de la SI (cSMAC)..... | 63 |
| 12. La modificación del último bucle extracelular de MAL afecta a la localización en la SI de otras proteínas..... | 66 |
| 13. La proteína MAL transporta a Lck a la SI..... | 69 |
| 14. La proteína MAL-FLAG afecta a las balsas de membrana presentes en la SI | 70 |

DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| 1. EL silenciamiento de la proteína MAL afecta a la formación de la SI en el linfocito T..... | 75 |
| 2. La proteína MAL se asocia con Lck y permite su incorporación en las balsas lipídicas y su transporte a membranas..... | 76 |

| | |
|--|----|
| 3. La expresión forzada de Lck en membranas en células carentes de MAL corrige una parte de los defectos tempranos en la formación de la SI..... | 77 |
| 4. La proteína MAL se trasloca a la SI..... | 79 |
| 5. Las balsas de membrana en la organización de la SI..... | 80 |
| 6. ¿Para qué sirve la SI?..... | 82 |
| 7. Paralelismo en las rutas de transporte especializado en el linfocito T y la células epitelial. Función de MAL..... | 83 |

CONCLUSIONES

| | |
|----------------------|----|
| 1. Conclusiones..... | 87 |
|----------------------|----|

BIBLIOGRAFÍA

| | |
|----------------------|----|
| 1. Bibliografía..... | 91 |
|----------------------|----|

ANEXO

| | |
|---------------|----|
| 1. Anexo..... | 99 |
|---------------|----|

INTRODUCCIÓN

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 1. | Estructura de las moléculas del MHC de clase I y de clase II | 4 |
| Figura 2. | Organización de la sinapsis inmunitaria (SI) | 6 |
| Figura 3. | Proceso dinámico de reconocimiento de antígeno y formación de microclusters de TCR | 8 |
| Figura 4. | Rutas de señalización durante la activación del linfocito T | 11 |
| Figura 5. | Transporte de proteínas a la SI en linfocitos T | 12 |
| Figura 6. | Estructura y regulación de la proteína Lck | 14 |
| Figura 7. | Modelo de estructura de las balsas de membrana | 15 |
| Figura 8. | La proteína MAL | 19 |
| Figura 9. | Función propuesta para MAL en células epiteliales polarizadas | 20 |
| Figura 10. | El mutante JTIM no expresa MAL | 22 |
| Figura 11. | Recuperación de la expresión de MAL en el mutante JTIM | 23 |
| Figura 12. | Defectos del mutante JTIM en la activación | 24 |

MATERIALES Y MÉTODOS

| | | |
|-------------------|---------------------------------------|-----------|
| Figura 13. | Esquema del plásmido pSupershMAL/GFP | 35 |
| Figura 14. | Aislamiento de las balsas de membrana | 39 |

RESULTADOS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Figura 15. | Efectos del silenciamiento de MAL | 46 |
| Figura 16. | El silenciamiento de MAL afecta a la distribución subcelular de Lck | 47 |
| Figura 17. | Asociación de la proteína Lck a membranas y DRMs | 48 |
| Figura 18. | Asociación entre MAL y Lck | 49 |
| Figura 19. | La expresión forzada de Lck en la membrana plasmática en la células JTIM corrige algunos de los defectos observados en la formación de la SI | 51 |
| Figura 20. | La expresión forzada de Lck en la membrana plasmática en la células JTIM no corrige los defectos observados en la señalización celular | 52 |
| Figura 21. | MAL y Lck presentan la misma distribución subcelular | 53 |
| Figura 22. | MAL y Lck viajan en las mismas vesículas hacia la membrana plasmática | 54 |
| Figura 23. | La proteína MAL es requerida para la formación de las vesículas transportadoras de Lck | 55 |
| Figura 24. | La ausencia de MAL no afecta al tráfico hacia la membrana plasmática de otras moléculas | 56 |
| Figura 25. | La proteína MAL es necesaria para la concentración de LAT en la SI | 57 |
| Figura 26. | La proteína MAL no es necesaria para el transporte de LAT a la membrana plasmática | 58 |
| Figura 27. | La proteína MAL se concentra en la SI | 59 |
| Figura 28. | La proteína MAL se concentra en la zona de contacto con la APC también en ausencia de antígeno | 60 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 29. Caracterización de los clones estables de células Jurkat que expresan las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG | 61 |
| Figura 30. Las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG son capaces de reemplazar funcionalmente a la proteína MAL endógena | 62 |
| Figura 31. La expresión de las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG no afecta a los procesos relevantes de activación en el linfocito | 64 |
| Figura 32. La modificación del último bucle hidrofílico de MAL deslocaliza la proteína al pSMAC | 65 |
| Figura 33. La mutación del último bucle extracelular e MAL deslocaliza la proteína a la zona periférica de la SI | 66 |
| Figura 34. La localización de MAL-FLAG en el pSMAC afecta a la distribución de las proteínas Lck y LAT en la SI | 67 |
| Figura 35. El efecto de la proteína MAL-FLAG sobre la distribución de Lck y LAT en el pSMAC es independiente de la expresión de la proteína MAL endógena | 68 |
| Figura 36. Dinámica de las proteínas Lck-GFP y LAT-GFP en presencia de la proteína MAL normal o modificada en su último bucle extracelular | 68 |
| Figura 37. La proteína Lck viaja en las mismas vesículas que MAL hacia la SI | 69 |
| Figura 38. La expresión de la proteína MAL-FLAG afecta a la distribución de las balsas lipídicas en la SI | 71 |

DISCUSIÓN

| | |
|---|-----------|
| Figura 39. Posible papel del último bucle hidrofílico en la estructura de la proteína MAL | 81 |
| Figura 40. Paralelismo en el transporte mediado por MAL en el epitelio y en el linfocito T | 83 |

INTRODUCCIÓN

1 EL LINFOCITO T COMO CÉLULA EFECTORA DEL SISTEMA INMUNITARIO

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa frente a agentes infecciosos. Para ello, cuenta con dos tipos de procesos: los mecanismos de la *inmunidad innata*, es decir, los que existen antes de que se desarrolle la infección (tales como barreras epiteliales, lisis por células NK, proteólisis por proteínas del complemento, etc...) y los de la *inmunidad adaptativa o específica*, específicos frente a la infección que se esté cursando. Los componentes de esta última son los linfocitos y sus productos (anticuerpos, citoquinas...).

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la humoral y la celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos. En la inmunidad humoral participan los anticuerpos, producidos por los linfocitos B, cuya función es reconocer específicamente antígenos microbianos para la eliminación del patógeno, neutralizando así la infección. En la inmunidad celular, participan los linfocitos T, que responden frente a microorganismos intracelulares y cuya función es eliminar las células infectadas por los mismos.

1.1 LOS LINFOCITOS T

Los linfocitos T son células con forma esférica, cuya parte predominante es el núcleo, que relega al citoplasma a una pequeña proporción de material que lo rodea. Los distintos tipos de linfocitos se diferencian en sus funciones, pero son indistinguibles desde el punto de vista morfológico y sólo pueden identificarse por la expresión de las proteínas y receptores presentes en su superficie.

Los precursores de los linfocitos se originan en la médula ósea. En humanos, los linfocitos B maduran en la misma médula; mientras que los linfocitos T migran al timo para completar su diferenciación.

Existen dos tipos de linfocitos T: los linfocitos T colaboradores, positivos para la expresión de la molécula CD4 en su membrana, y los linfocitos T citotóxicos, positivos para la expresión de la molécula CD8.

1.2 PRESENTACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENO

Los linfocitos T reconocen el antígeno presentado por una célula presentadora (APC), en el contexto de las proteínas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Existen dos tipos de MHC, clase I y clase II. Las proteínas de estos complejos tienen una serie de características estructurales y funcionales comunes, pero difieren en el tipo de

células que los expresan y el tipo de antígenos que presentan. Las proteínas del complejo MHC I se asocian a la $\beta 2$ microglobulina para formar heterodímeros $\alpha\beta$. El complejo MHC de clase I se expresa en todas las células nucleadas del organismo y es el encargado de presentar péptidos que provienen de antígenos sintetizados en el citoplasma celular, como por ejemplo, antígenos virales. El MHC de clase II codifica por distintas subunidades α y β , que se asocian entre sí formando distintos heterodímeros $\alpha\beta$. Se expresa exclusivamente en la membrana de las células presentadoras profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B).

Ambos tipos de heterodímeros $\alpha\beta$ del MHC presentan un surco o hendidura donde se aloja el fragmento antigénico que será presentado a la célula T. Los residuos aminoacídicos polimórficos de las moléculas del MHC se localizan en esta hendidura y en las zonas adyacentes a ella. Además, las moléculas de MHC tienen dominios tipo inmunoglobulina (Ig), no polimórficos, por los que interaccionan con las moléculas CD4 y CD8 de las células T.

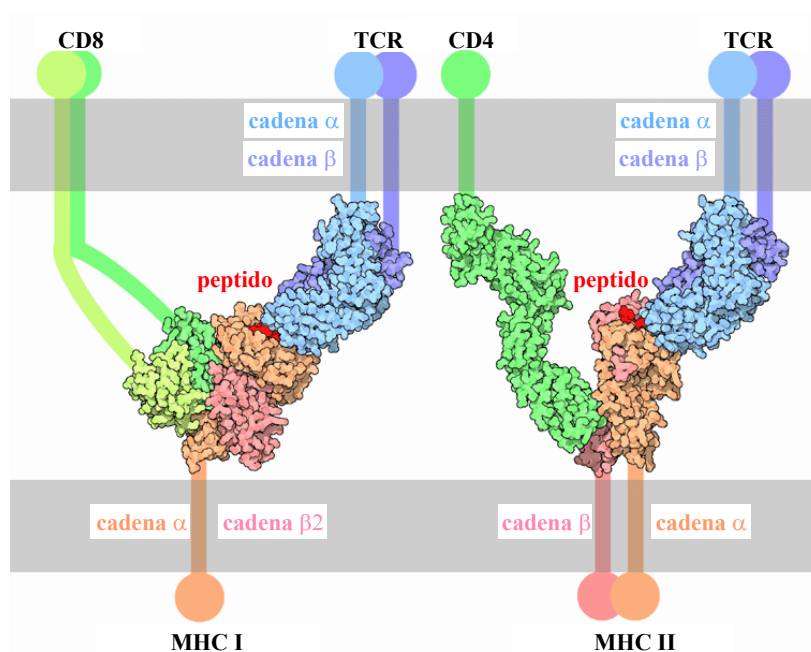


Figura 1. Estructura de las moléculas del MHC de clase I y de clase II. La figura muestra las cadenas α y β de los complejos de histocompatibilidad y ejemplifica el reconocimiento por parte del TCR de los péptidos presentados por el MHC. En el dibujo se muestran también los correceptores CD4 y CD8, que reconocen zonas invariables de las cadenas del MHC.

El reconocimiento de antígeno por parte de las células T se lleva a cabo mediante el receptor de antígeno de las células T (TCR). Al igual que ocurre con el MHC, el TCR es ampliamente polimórfico, lo que le dota de la capacidad potencial de reconocer cualquier antígeno peptídico presentado por el MHC. El TCR está formado por dos cadenas polipeptídicas de la superfamilia de las inmunoglobulinas denominadas α y β (una pequeña

subpoblación expresa las cadenas γ y δ), unidas entre sí por puentes disulfuro. A estas dos cadenas se les asocian las subunidades de CD3, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ . A diferencia de las cadenas del TCR, los componentes de CD3 tienen tallos citoplasmáticos largos, y son los responsables de la asociación con las proteínas que forman los complejos de señalización. Esta asociación está mediada fundamentalmente por un motivo basado en una doble tirosina presente en una copia en las cadenas γ , δ y ϵ y en tres copias en la cadena ζ (Reth, 1989). Este motivo, denominado motivo de activación de receptor inmune basado en tirosinas (ITAM), es fosforilado durante la activación del linfocito.

El reconocimiento de un antígeno por parte del TCR no es señal suficiente para activar al linfocito T, sino que es necesaria una segunda señal proporcionada por moléculas coestimuladoras como CD28.

Un caso distinto de presentación antigénica tiene lugar con los *superantígenos*. Éstos son un grupo de productos bacterianos y virales que estimulan gran cantidad de linfocitos T sin necesidad de procesamiento. Son presentados por el MHC de clase II, al que se unen en zonas distintas que los péptidos antigénicos convencionales (Li et al., 1999). Reconocen la zona variable de la cadena β del TCR, y es el subtipo de esta cadena lo que dota a los linfocitos T de especificidad de respuesta frente a los distintos superantígenos. En la Tabla I se muestran los superantígenos más comunes y el subtipo del TCR que los reconoce.

| Superantígeno | | SEA | SEB | SEC ₁ | SEC ₂ | SEC ₃ | SED | SEE |
|-----------------------------------|--------|-------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| Especificidad V β de TCR | Humano | ND | 3;12;14;15; 17;20 | 12 | 12;13;14;15; 17;20 | 5;12 | 5;12 | 5.1;6.1- 6.3;8;18 |
| | Ratón | 1;3;10; 11;12; 17 | 3;7;8.1;8.3; 11;17 | 7;8.2; 8.3;11 | 8.2;10 | 3;7;8.2 | 3;7;8.2; 8.3;11;17 | 11;15; 17 |

Tabla I. Superantígenos. Correspondencia entre los distintos tipos de superantígenos y los subtipos de TCR específicos para cada uno, en humano y en ratón. ND, no determinado.

1.3 LA SINAPSIS INMUNITARIA

La activación de la célula T requiere el reconocimiento de un antígeno presentado por una APC. En un primer momento, la célula T contacta con la APC a través de moléculas de adhesión. Sirviéndose de su TCR, rastrea la superficie de la APC en busca de antígeno. Si ésta presenta un antígeno en superficie que sea reconocido por su TCR, la célula T polarizará ciertos receptores y moléculas de membrana hacia la zona de contacto, haciendo que la unión entre célula T-APC se haga estable. A esta unión formada en la zona de contacto entre ambas células se le da el nombre de sinapsis inmunitaria (SI), por su parecido morfológico con las uniones que se establecen entre neuronas del sistema nervioso. La sinapsis inmunitaria representa, por tanto, la zona de contacto entre la célula T y la APC y contiene un agrupamiento polarizado de receptores y moléculas accesorias presentes en la membrana de la célula T.

Las moléculas presentes en la SI no están entremezcladas, sino que se organizan en una estructura supramolecular denominada complejo supramolecular de activación (SMAC). Se observó además que las moléculas esenciales para la activación segregaban a partes muy concretas de la SI (Monks et al., 1998; Monks et al., 1997). Tal es el caso del TCR y la PKC- θ , que quedan agrupados y confinados a una zona central (cSMAC) rodeados de moléculas de adhesión (LFA-1 ICAM-1), y proteínas del citoesqueleto de actina, como la talina, que forman un anillo concéntrico (pSMAC) rodeando al cSMAC. Ciertas proteínas transmembrana (CD45) y de citoesqueleto que quedan excluidas de la zona de contacto, definiendo una parte más distal (dSMAC) (Shaw, 2001) (Figura 2).

Aunque el mecanismo molecular responsable de la organización del SMAC no se conoce actualmente, su alto grado de ordenamiento sugiere que podría desempeñar una función importante en la respuesta del linfocito T.

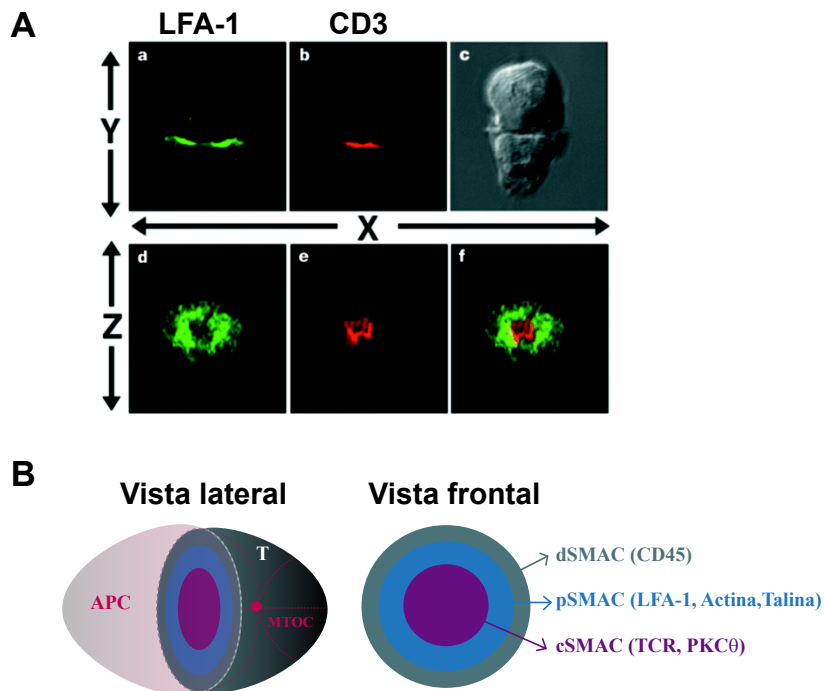


Figura 2. Organización de la sinapsis inmunitaria (SI). (A) Imagen de microscopio confocal de un conjugado de una célula T y una célula presentadora. Paneles a-c, vista de un plano horizontal, en la zona central de la célula, en rojo, CD3, en verde, LFA-1, a ambos lados de la zona central. Paneles d-f, reconstrucción ortogonal de la zona de la SI; en el centro, CD3, y rodeándolo, LFA-1. Imagen tomada de Monks et al., 1998. (B) esquema de la organización de la SI. En la zona central o cSMAC, se acumula el TCR y la quinasa PKC- θ . En la zona más periférica o pSMAC, se concentran moléculas de adhesión (LFA-1, ICAM-1) y proteínas del citoesqueleto de actina (talina). La zona más distal o dSMAC está enriquecida en proteínas transmembrana como CD45.

Aunque el término SI fue acuñado originalmente para describir la zona de contacto entre una célula T y una célula B, hoy en día es usado genéricamente para describir la superficie de contacto entre cualquier célula efectora linfoide (T, B o NK) y una APC o una célula diana. De esta manera, el término SI no necesariamente implica la segregación de proteínas en la zona de contacto en cSMAC y pSMAC.

1.4 **LA HIPÓTESIS DE LOS MICROCLUSTERS**

Aunque en principio se pensó que el SMAC podría estar implicado en el ensamblaje de la maquinaria responsable de la señalización, los estudios dinámicos mostraron que la activación del linfocito T era anterior a la formación de la sinapsis inmunitaria (Lee et al., 2002), por lo que se descartó que la SI actuara como plataforma para inicio de las señales de activación.

La confirmación de que el ordenamiento característico del SMAC no era necesario para la activación llegó con los experimentos que demostraban que las células T colaboradoras podían ser completamente activadas bajo condiciones que no suponían la acumulación del TCR en la SI (Hailman et al., 2002). Este tipo de sinapsis multifocales podían encontrarse cuando actuaba como presentadora una célula dendrítica (Dustin et al., 2006), sugiriendo que este tipo de sinapsis podrían darse también en condiciones *in vivo*.

La existencia de sinapsis multifocales nos indica que agrupaciones pequeñas de TCR son suficientes para que se dé la activación del linfocito T. Usando bicapas lipídicas artificiales, se demostró que el TCR se agrupa en pequeños acúmulos (microclusters) que van migrando hacia el centro del contacto, donde coalescen (Figura 3, A y B), formando el cSMAC (Grakoui et al., 1999). Posteriormente, también se observaron este tipo de estructuras durante la formación de conjugados T-APC (Krummel et al., 2000) (Figura 3C).

Mediante experimentos en los que se inhibía la formación de los microclusters de TCR, se demostró que éstos juegan un papel predominante en la generación de la señal inicial de activación (Varma et al., 2006). La despolimerización de los filamentos de actina afecta a la migración de los microclusters y a la formación del cSMAC, lo que sugiere que el citoesqueleto de actina podría participar en su movimiento centrípeto hacia el cSMAC (Bunnell et al., 2002).

El modelo que se acepta actualmente implica que los microclusters de TCR portan también moléculas de ZAP-70 y que, en respuesta a un antígeno, se asocian con otro tipo de microclusters formados por moléculas adaptadoras como LAT y SLP-76 (Bunnell et al., 2006; Yokosuka et al., 2005). De esta manera, la quinasa ZAP-70 sería capaz de acceder a estos adaptadores y fosforilarlos, comenzando así la cascada de señalización. La colocalización en estos microclusters de las formas activas de ZAP-70, LAT y Lck es otra evidencia más a favor de este modelo (Campi et al., 2005).

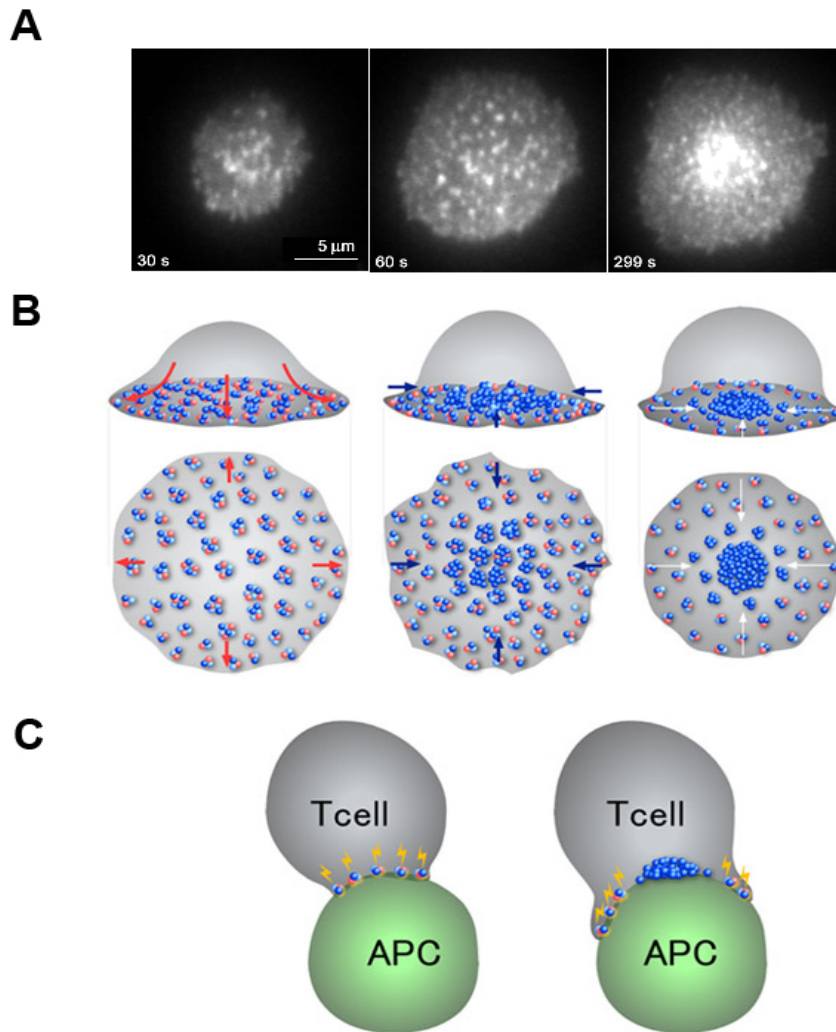


Figura 3. Proceso dinámico de reconocimiento de antígeno y formación de microclusters de TCR. (A) Imágenes secuenciales obtenidas por microscopía TIRF que muestran la formación y la migración de los microclusters de TCR en respuesta al contacto con una bicapa lipídica que presenta un antígeno asociado a moléculas de MHC. (B) Modelo propuesto para explicar la formación y migración de los microclusters. La célula T contacta con una bicapa lipídica que contiene complejos MHC-péptido e ICAM-1 y se forman microclusters de TCR en la interfase que contacta con la bicapa. Tras el primer contacto, la célula se expande, adheriéndose más al sustrato y formando nuevos microclusters. Tras la expansión, la célula T comienza a contraerse, y los microclusters migran hacia el centro de la superficie del contacto. Durante este proceso, los microclusters coalescen entre sí para formar agregados de tamaño mayor. El TCR termina por concentrarse en el centro, mientras nuevos microclusters se van generando en la periferia y migrando hacia la zona central. Los microclusters está formados por distintos componentes: TCR, ZAP-70, SLP-76 y CD28. (C) Se ha postulado que el mismo proceso de formación y coalescencia de los microclusters del TCR observado con células T en contacto con bicapas lipídicas artificiales ocurre también cuando la célula T contacta con una APC. Adaptado de Saito and Yokosuka, 2006.

1.5 FUNCIÓN DE LA SINAPSIS INMUNITARIA

El alto grado de ordenamiento de la sinapsis llevó a pensar que el ensamblaje de la misma podía ser necesario para el inicio de la activación del linfocito T. La demostración de que la señalización se iniciaba en los microclusters de TCR de forma previa a la formación del SMAC descartó esta idea. ¿Cuál es entonces la función de la sinapsis inmunitaria?

En el caso de las células T citotóxicas, se podría pensar que la sinapsis juega un papel “orientativo” o de direccionalidad, es decir, indicando a la célula T hacia dónde debe polarizar las vesículas citolíticas destinadas a la eliminación de la célula infectada, a la que permanece establemente unida gracias a la formación de la SI. La secreción direccionada, también parece ser importante en células T colaboradoras (Poo et al., 1988). En este proceso la reorientación del centro organizados de microtúbulos (MTOC) y del compartimento endosomal juegan un papel importante (Stinchcombe et al., 2006). No obstante, existen dos mecanismos de secreción que coexisten en las células T: uno direccionado hacia la SI y otro no direccionado (Huse et al., 2006).

Otra función propuesta para el cSMAC, es la de ser el lugar donde se induce el proceso que conduce a la degradación del TCR y de otras moléculas implicadas en señalización (Lee et al., 2003). En el caso del TCR, este complejo es internado en vesículas recubiertas de clatrina (Crotzer et al., 2004) y es degradado por el lisosoma o por el proteasoma. La proteína adaptadora LAT también sufre internación, pero parece que no se asocia a clatrina, sino a balsas lipídicas (Barr et al., 2006).

1.6 RUTAS DE ACTIVACIÓN

Una vez se ha producido el reconocimiento del antígeno por parte de la célula T, tiene lugar una cascada de señalización, que desemboca en la activación del linfocito. Uno de los primeros eventos que ocurren es la fosforilación de los residuos de tirosina de los motivos ITAM (YXXLX6-8YXXL, donde Y= Tirosina, L=Leucina y X=cualquier aminoácido) presentes en las cadenas de CD3 (una copia en las subunidades γ , δ , ϵ y tres copias en la subunidad ζ) asociadas al TCR. Estas fosforilaciones son llevadas a cabo por las tirosina quinasas de la familia Src Lck y Fyn. Los residuos de tirosina fosforilados de los ITAM del CD3 son puntos para el anclaje de la tirosina quinasa ZAP-70 a través de sus dominios SH2 (Lin and Weiss, 2001). ZAP-70 fosforila adaptadores como LAT, que recluta otra serie de moléculas como la PLC- γ 1, Grb2, Gad, Vav, ect. directamente o a través de otras moléculas adaptadoras como SLP-76.

Durante todo el proceso de activación, se produce también una reorganización importante del citoesqueleto celular. SLP-76, Vav, Nck y ADAP forman parte de un complejo que activa las Rho-GTPasas Rac y Cdc42, que, a su vez, activan proteínas como WASP y

WAVE2 que promueven la formación de filamentos de actina a través del complejo Arp2/3 (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Aunque en un principio se identificó, mediante el uso de dominantes negativos, a la GTPasa Cdc42 como la responsable de la reorientación del MTOC a la SI. Estudios más recientes utilizando técnicas de silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi), indican que es Rac1 y no cdc42 la GTPasa de la familia Rho que regula este proceso (Gomez et al., 2007).

Estos eventos iniciales desembocan en la activación de tres factores de transcripción necesarios para la producción de ARNm de IL-2:

- Vía de activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT)

Cuando es reclutada a la membrana, la PLC- γ 1 hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato presente en la misma, dando dos productos que actúan como segundos mensajeros: diacilglicerol e inositol 1,4,5 trifosfato. Este último se une a sus receptores, presentes en la membrana del retículo endoplasmático; esto hace se abran los canales de calcio y que se libere el citoplasma el Ca^{2+} almacenado en este reservorio. Los altos niveles de calcio hacen que la calmodulina deje de inhibir a la calcineurina. Esta fosfatasa, una vez activa, defosforila al factor de transcripción NFAT, que ahora puede pasar al núcleo para activar la transcripción del gen de la interleuquina-2, interleuquina-4 y TNF (revisado, Macian, 2005).

- Vía de activación del complejo AP-1

El DAG producto de la PLC- γ 1 activa a la proteína-quinasa C (PKC) y a la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina RasGRP. Estas proteínas, junto a Sos, reclutada vía LAT-Grb2, activan la ruta de la MAP quinasa ERK1/2, que desemboca en la activación de la transcripción de Fos. Por otra parte, las MAP quinasas JNK y p38, están implicadas en la transcripción del gen de Jun. El producto de la traducción de este último, junto con el producto del gen Fos, forman el complejo AP-1.

- Vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B)

La activación de la PI3K a través de la molécula coestimuladora CD28, conlleva una activación de la quinasa AKT, lo cual, sumado a la activación de la PKC por parte del diacilglicerol, hace que se active la quinasa que fosforila al inhibidor del factor NF- κ B (I κ B), que lo mantiene secuestrado en el citoplasma. El NF- κ B, una vez liberado de su inhibidor, es capaz de pasar al núcleo y promover, junto a NF-AT y al complejo AP-1, la transcripción del gen de IL-2.

Introducción



Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

caso de los linfocitos T citolíticos se observó que la secreción de gránulos citotóxicos (que contienen perforinas y granzimas) se hacía desde el centrosoma y de manera polarizada hacia la SI (Stinchcombe et al., 2006), y, más concretamente, hacia el cSMAC, que se quedaba libre de la actina subcortical para producirse la liberación del contenido de los gránulos (Stinchcombe et al., 2006).

También en el caso de conjugados entre linfocitos T y células presentadoras, se ha descrito la existencia de un tráfico vectorial hacia la SI (Batista et al., 2004; Das et al., 2004). Estos estudios muestran que, tras la activación, el TCR y otras moléculas que se concentran

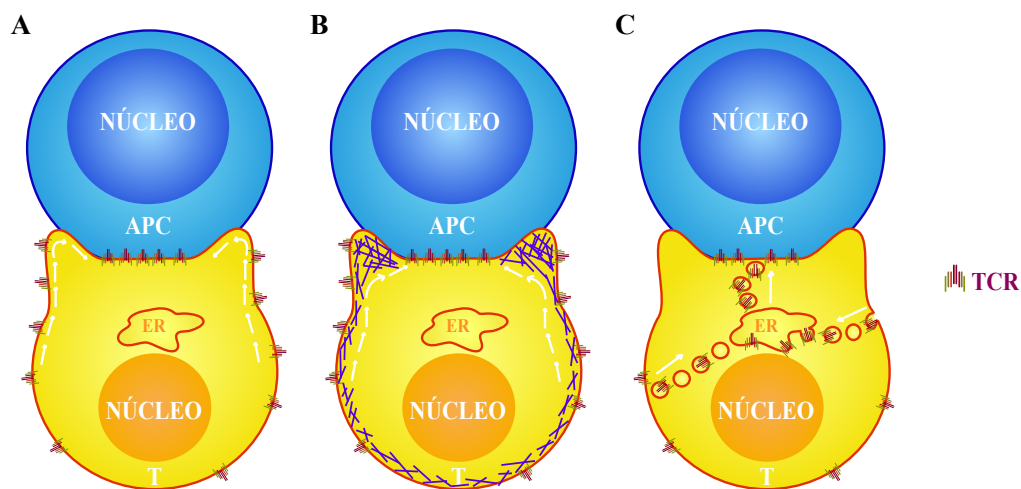


Figura 5. Transporte de proteínas a la SI en linfocitos T. El transporte de proteínas a la SI puede darse por distintas vías: (A) difusión por la membrana, (B) transporte asociado a proteínas de citoesqueleto o (C) endocitosis de la proteína y reciclaje polarizado a la SI. Este último ha sido el modelo propuesto para la polarización del TCR. Cuando el complejo TCR es endocitado, las vesículas alcanzan el compartimento endosomal de reciclaje (ER), desde donde una parte del TCR es reciclado a membrana. Cuando se produce el reconocimiento antigénico, este reciclaje a membrana del TCR se hace de forma polarizada hacia la zona de la SI.

rápidamente en la zona de la SI, sufren un proceso de endocitosis y reciclaje polarizado a la zona de contacto (Das et al., 2004) (Figura 5).

Para otras moléculas que acuden a la SI, como Lck y LAT, parece que hay dos reservorios distintos, uno que viaja por difusión a través de la membrana y otro asociado a estructuras exo-endocíticas, que es transportado una vez establecida la sinapsis (Bonello et al., 2004; Ehrlich et al., 2002).

Otro tipo de transporte especializado ocurre durante el "apagado" de la señal establecida al inicio de la S.I. En este caso, el TCR acumulado en la zona sufre una endocitosis, lo que hace que deje de transmitir señales, y, en vez de ser reciclado a la superficie, es conducido a la ruta degradativa. Para este mecanismo, parece ser esencial la clatrina, que podría tener también un papel en la conducción de los complejos de TCR endocitados hacia

el lisosoma (Crotzer et al., 2004). En el caso de BCR, esta endocitosis es dependiente, además de la clatrina fosforilada, de las balsas lipídicas, lo que sugiere que quizás esté operando un mecanismo similar para el caso del TCR (Stoddart et al., 2002).

La ubiquitinación también es una señal de endocitosis y direccionamiento a lisosoma o proteasoma para la degradación de la proteína ubiquitinada. Se sabe que el TCR se ubiquitina después de iniciada la S.I. La ubiquitinación de la cadena CD3 ζ ha sido correlacionada con la internación del TCR en compartimentos endosomales y posterior degradación en células T activadas.

En la internación de otras moléculas relevantes en la señalización, como LAT, parece que la ubiquitinación por parte de la ubiquitina ligasa c-Cbl y la maquinaria de endocitosis que reconoce proteínas ubiquitinadas juegan un papel importante en su endocitosis (Balagopalan et al., 2007).

1.8 **ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y TRANSPORTE DE LA PROTEÍNA LCK**

Lck es una proteína de la familia de las Src quinasas que juega un papel importante durante los eventos tempranos de la señalización en el linfocito. Presenta una serie de dominios que llevan a cabo distintas funciones (Sicheri and Kuriyan, 1997). El extremo N-terminal presenta señales de acilación: la glicina en posición 2 es modificada mediante la adición de una molécula de ácido mirístico y las cisteínas 3 y 5, de un ácido palmítico cada una. Gracias a estos anclajes lipídicos, la proteína se asocia a la cara interna de la membrana plasmática (Kabouridis et al., 1997; Rodgers et al., 1994; Shenoy-Scaria et al., 1993). Lck presenta también un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio catalítico con actividad quinasa.

La actividad de Lck está regulada por la fosforilación de dos residuos de tirosina importantes, uno localizado en el dominio catalítico de la proteína y otro en el extremo C-terminal. La tirosina del extremo C-terminal (Y505 en humanos), cuando está fosforilada, interacciona con el dominio SH2 de la molécula, haciendo que la proteína se encuentre en una conformación plegada y de baja actividad.

La conversión entre la forma cerrada y abierta de la proteína está regulada por la acción de otras proteínas: la quinasa Csk fosforila la Y505 e inhibe la actividad de Lck (Bergman et al., 1992), mientras que la fosfatasa CD45 defosforila esa misma tirosina para favorecer la conformación abierta (Penninger et al., 2001). La autofosforilación de la tirosina del dominio catalítico (Y394), hace que la proteína adquiera una mayor actividad (Yamaguchi and Hendrickson, 1996) (Figura 6).

La fosfatasa CD45 también puede defosforilar la tirosina 394, lo que haría que Lck se convirtiera a un estado de baja actividad, jugando así un papel como regulador negativo (D'Oro and Ashwell, 1999).

Se sabe que Lck utiliza la vía exocítica para viajar hacia la membrana plasmática (Bijlmakers and Marsh, 1999). Tras su biosíntesis, Lck se asocia a membranas de manera dependiente de su palmitoilación. Esta asociación a membranas es necesaria para la interacción de Lck con las moléculas CD4 y CD8.

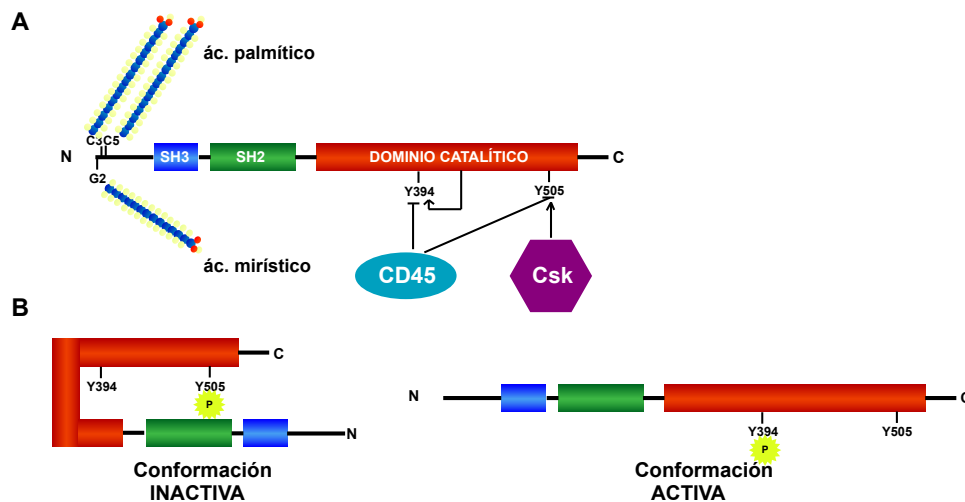


Figura 6. Estructura y regulación de la proteína Lck. (A) Lck presenta un dominio SH3, un dominio SH2 y un dominio catalítico con actividad quinasa. En su extremo amino terminal posee tres residuos acilables: la glicina en posición 2 sufre la adición de un resto de ácido mirístico, y las cisteínas 3 y 5, de ácido palmítico. La incorporación de Lck en las balsas de membrana depende de la adición de grupos acilo. La regulación de la quinasa viene dada por la fosforilación de dos residuos clave, la tirosina 394 (Y394) y la tirosina 505 (Y505). La quinasa Csk es la responsable de la fosforilación de la Y505, mientras que el grupo fosfato de la Y394 se añade por autofosforilación de la misma Lck. La fosfatasa CD45 es la responsable de la defosforilación de ambos residuos. (B) Lck puede presentar dos conformaciones: en la conformación inactiva, la Y505 fosforilada interacciona con el dominio SH2 de la propia Lck y hace que la molécula adquiera una conformación cerrada, dejando el dominio catalítico inaccesible para sus sustratos. Cuando CD45 defosforila la Y505, la molécula se “abre” y se autofosforila en la Y394, adquiriendo su conformación activa.

2 LAS BALSAS DE MEMBRANA

2.1 ESTRUCTURA DE LAS BALSAS DE MEMBRANA

Según el modelo clásico del “mosaico fluido”, las membranas son consideradas como una mera barrera lipídica que separan dos medios acuosos de diferente composición: el citosol y el medio extracelular. Bajo esta concepción, las membranas eran bicapas lipídicas uniformes, con una composición lipídica desordenada, con lípidos y proteínas moviéndose y difundiendo libremente. Este modelo ha ido variando teniendo en cuenta, por una parte, las diferentes propiedades físicoquímicas de los lípidos (Brown and London, 1997) y su distribución asimétrica en las dos hemimembranas y, por otra parte, las evidencias a favor de la existencia de microdominios ordenados en la membrana.

Las membranas celulares contienen glicerofosfolípidos, moléculas formadas usando como esqueleto una molécula de glicerol a la que se unen dos ácidos grasos mediante un enlace tipo éster. Además, las membranas de los eucariotas, particularmente la membrana plasmática, contienen glicosfingolípidos y esteroides (en vertebrados, principalmente colesterol). Los glicosfingolípidos contienen ácidos grasos saturados de cadena larga (16-26 carbonos). El esqueleto de ceramida facilita los enlaces de hidrógeno fundamentalmente con el colesterol, cuyo anillo de esteroide le confiere una estructura rígida.

La abundancia relativa de estos lípidos en la membrana varía en los diferentes tipos celulares, siendo siempre los glicerofosfolípidos los más abundantes, pero llegando la esfingomielina y el colesterol a suponer un 10-20% y un 30-40% respectivamente. Los glicosfingolípidos están siempre en una pequeña proporción, con alguna excepción como la barrera epitelial (Simons and van Meer, 1988), y se presentan, exclusivamente, en la hemimembrana externa.

El hecho de que los glicosfingolípidos tiendan a asociarse entre sí y que estas asociaciones sean incluso más fuertes en presencia de colesterol, llevó a una revisión del modelo de mosaico fluido y sugerir un nuevo modelo en el que la membrana presentaría en general una estructura desordenada, formada por los fosfolípidos insaturados, pero existirían flotando, a modo de “balsas”, microdominios de estructura más ordenada, ricos en glicosfingolípidos y colesterol, denominados balsas de membrana (Simons and Wandinger-Ness, 1990) (Figura 7)

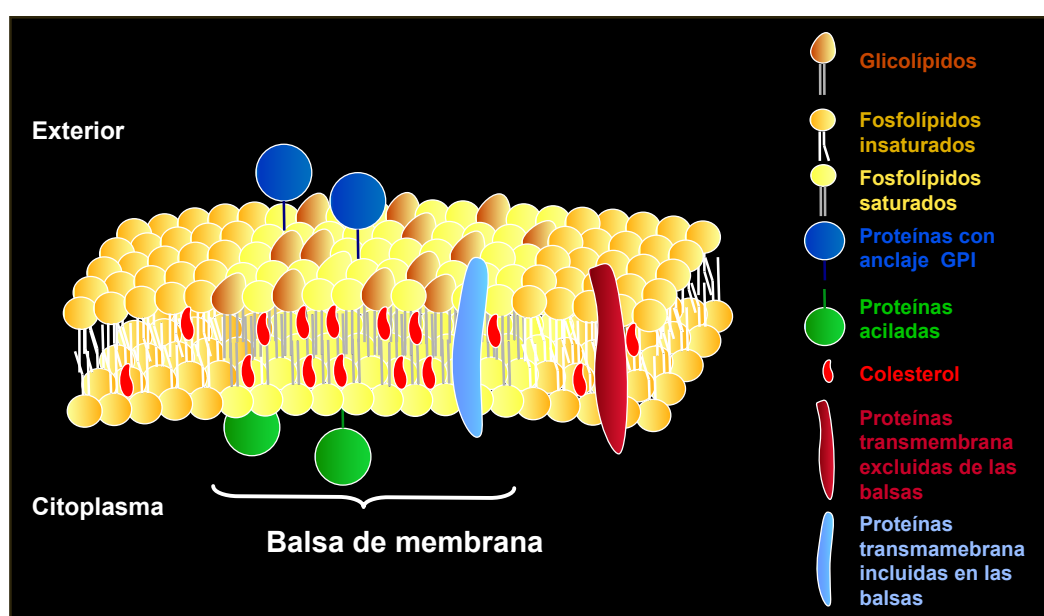


Figura 7. Modelo de estructura de las balsas de membrana. Los glicosfingolípidos y la esfingomielina están presentes únicamente en la hemimembrana externa, mientras que el colesterol está en ambas hemimembranas. Las balsas de membrana están enriquecidas en glicosfingolípidos, colesterol y fosfolípidos insaturados y de cadena larga. Las proteínas incluidas en estos microdominios suelen ser proteínas citoplásmicas ancladas a la membrana por cadenas de ácidos grasos (mirístico y palmítico) unidos covalentemente (Lck, Fyn), proteínas con grupos GPI (CD59) o simplemente proteínas integrales cuya región transmembrana es afín por estos microambientes altamente ordenados.

2.2 AISLAMIENTO DE LAS BALSAS DE MEMBRANA. CONTROVERSIDAD SOBRE SU EXISTENCIA

Los métodos utilizados para el aislamiento de las balsas de membrana se basaron en las propiedades fisicoquímicas particulares que les confieren su alto contenido en lípidos y colesterol, que hace que las balsas resistan a la solubilización con detergentes no iónicos (como el Tritón X-100) a 4°C. Estas membranas insolubles pueden ser separadas del resto de los componentes celulares (moléculas solubles y material solubilizado) cuando se les somete a ultracentrifugación de equilibrio en un gradiente de densidad de sacarosa. De esta manera, las membranas insolubles (y sus moléculas asociadas) pueden ser aisladas en las fracciones de menor densidad del gradiente. Por este motivo, a las fracciones de membrana aisladas por este procedimiento se las denomina DRMs (membranas resistentes a detergente), GEMs (membranas enriquecidas en glicolípidos) o DIGs (membranas insolubles en detergente enriquecidas en glicosfingolípidos). Se postuló que estas membranas insolubles derivarían de las balsas de membrana celulares y estarían enriquecidas en ellas.

El uso de diferentes detergentes no iónicos o de distintas concentraciones del mismo detergente para aislar los DRMs (Tritón X-100, Tritón X-114, Brij 96, Brij 98, Brij 58, Lubrol WX,...) sugiere la existencia de diferentes tipos de balsas que difieren en su composición proteica y lipídica (Cerny et al., 1996; Millan et al., 1997a; Roper et al., TX-100, 2000). Así se ha hablado de balsas de Tritón X-100 o balsas de Lubrol, o de balsas de 1% Tritón X-100, de 0,1% Tritón X-100, etc...

Precisamente, una de las mayores críticas a la existencia de las balsas *in vivo* deriva del hecho de que, con el procedimiento de extracción, se estén generando DRMs que no estén presentes en la célula (Heerklotz, 2002), produciendo una reorganización de las membranas de tal forma que las proteínas que estuvieran excluidas de las balsas aparecieran juntas después de la extracción. Otro inconveniente del aislamiento *in vitro* de las balsas es que el detergente estuviera solubilizando parcialmente las balsas, por lo que aparecerían solubilizadas proteínas o lípidos que realmente estarían incluidos en estos microdominios (Brown and London, 1997; Brown and London, 2000). De hecho, los análisis proteómicos han demostrado la existencia de “contaminantes” en las preparaciones de DRMs (Foster et al., 2003; von Haller et al., 2001).

Aunque también se diseñaron métodos de extracción sin la utilización de detergentes, hoy en día se emplean otras técnicas complementarias para realizar el estudio de las balsas. Así, mediante estudios de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) se han visualizado microdominios de membrana ricos en proteínas ancladas por GPI (Varma and Mayor, 1998). Recientemente, mediante el empleo de un compuesto químico como el Laurdan, que emite en distinta longitud de onda según su entorno lipídico, se ha demostrado

la existencia de regiones lipídicas con un grado mayor de ordenamiento en las membranas celulares (Gaus et al., 2006).

2.3 MAQUINARIA PROTEICA DE LAS BALSAS DE MEMBRANA

Existen ciertas proteínas que, bien por su hidrofobicidad, bien por sus modificaciones postraduccionales (acilaciones, asociación a GPI, etc.) se asocian con los microdominios de membrana ricos en glicoesfingolípidos y colesterol. Se ha postulado que alguna de estas proteínas podría actuar como “scaffold”, formándose oligómeros de la misma que aumentarían la afinidad por ciertos lípidos, creándose microdominios lipídicos. La estructura lípido-proteína de estos microdominios puede ser considerada como un “scaffold” que organiza los ligandos, aunque también la afinidad de éstos por un determinado tipo de proteínas o lípidos, puede darle forma a los microdominios de membrana (Bauer and Pelkmans, 2006). Proteínas que organizan microdominios de membrana de este modo son la familia de las caveolinas (Parton and Simons, 2007), las flotilinas (Hansen and Nichols, 2009), anexinas (Gerke et al., 2005) y proteínas con dominios MARVEL (Sanchez-Pulido et al., 2002).

2.4 LAS BALSAS DE MEMBRANA Y LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

Se conoce que, tras la estimulación, el TCR induce su asociación con las balsas lipídicas. De hecho, es en las fracciones de DRMs donde se detecta casi exclusivamente el aumento de la fosforilación en residuos de tirosina promovida por la activación (Xavier and Seed, 1999).

Se sabe que la fosforilación en residuos de tirosina de las cadenas de CD3 es mediada por Lck y Fyn, quinasas ambas presentes mayoritariamente en las balsas de membrana. No obstante, no se ha podido explicar cómo el TCR es capaz de aumentar su afinidad por las balsas de membrana tras la estimulación. Además, la asociación del TCR con las balsas tras la estimulación, no es suficiente para iniciar la señalización; es necesario también un aumento en la actividad de la Lck. Esto supone un proceso de entrada-salida de componentes de las balsas, de tal manera que estos microdominios compartimentalicen a quinasas/fosfatasa y sus sustratos, haciéndolos accesibles a unas y apartándolos de las otras.

Una serie de artículos independientes describían a finales de la pasada década que tras la estimulación de los linfocitos T, el TCR y una serie de receptores de membrana y moléculas señalizadoras eran incluidos en la fracción de los DRMs (Millan et al., 2001). Esta observación nueva propone que la estimulación induce la agregación de las balsas y el ensamblaje de la maquinaria de señalización (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998; Zhang et al., 1998).

Además de las moléculas cuya presencia en las balsas es inducida tras la estimulación celular, otras proteínas del linfocito T se encuentran en este tipo de membranas también en células en reposo. De entre estas moléculas, las más importantes son la tirosina quinasa Lck y la proteína adaptadora LAT.

En el caso de Lck la acilación en su extremo N-terminal es la responsable de la inclusión de la misma en las balsas lipídicas (Kabouridis et al., 1997; Shenoy-Scaria et al., 1993). En células Jurkat, aproximadamente un 50% de Lck copurifica con la fracción de DRMs (Anton et al., 2008). Esta inclusión en rafts parece requerida para la función de Lck puesto que, cuando esta quinasa no se incluye en las balsas lipídicas, es incapaz de fosforilar al TCR (Anton et al., 2008; Kabouridis et al., 1997). Además, la Lck presente en los DRMs está predominantemente fosforilada en la Y505, en comparación con aquella aislada de la fracción soluble.

A grandes rasgos, la formación de la SI se acompaña de una reorganización profunda de las membranas existentes en el interior y en la superficie celular (Alonso and Millan, 2001; Harder et al., 2007; Rentero et al., 2008; Zech et al., 2009) y es bloqueada por el tratamiento con agentes que alteran la composición lipídica de las balsas, por lo que se postuló que las balsas podrían actuar como plataformas para el ensamblaje del SMAC. Sin embargo, este modelo ha sido relegado al observarse que la función de la SI puede explicarse simplemente mediante interacciones proteína-proteína (Douglass and Vale, 2005). Esto, sin embargo, no invalida la idea de que el ensamblaje de la maquinaria de señalización se produzca en las balsas.

3 LA FAMILIA MAL DE PROTEÍNAS

El gen *MAL* fue aislado durante una búsqueda de genes que se expresaran de forma diferencial a lo largo del desarrollo del linfocito T humano (Alonso and Weissman, 1987). El gen consta de 4 exones (Rancano et al., 1994) y se encuentra localizado en la región cen-q13 del cromosoma 2 humano (Alonso et al., 1988).

MAL es el miembro fundador de la familia MAL de proteínas, que consta de 8 miembros: MAL, MAL-2, BENE, la subfamilia MYADM (MYADM, MYADM-L, MYADM-S) y plasmolipina (PLLP y PLLP2), que comparten una serie de características comunes.

El análisis bioinformático de las secuencias aminoacídicas de estas proteínas ha permitido definir un motivo denominado MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link), presente en todos los miembros de la familia MAL y en otras familias de proteínas (sinaptofisinas, sinaptogirinas, ocludina) cuya función está relacionada con procesos de yuxtaposición/fusión de membranas y/o tráfico intracelular de proteínas (Sanchez-Pulido et al., 2002).

3.1 LA PROTEÍNA MAL

MAL es una proteína integral de membrana, no glicosilada, de 17 kDa. El perfil de hidrofobicidad para su secuencia aminoacídica predice cuatro segmentos transmembrana, conectados entre sí por bucles hidrofílicos cortos (Figura 8A). Sus extremos amino y carboxilo terminales quedan expuestos hacia el citoplasma. La característica bioquímica más relevante de la proteína MAL es su alta hidrofobicidad; Esta característica hace que, mientras la mayoría de las proteínas se reparten a la fase acuosa, la proteína MAL lo hace junto con los lípidos celulares a la fase orgánica cuando las células son extraídas con los disolventes comúnmente utilizados para la extracción de los lípidos celulares. Por esta propiedad, MAL ha sido incluido dentro del llamado grupo de los proteolípidos, proteínas con características lipídicas que fraccionan junto con los lípidos celulares.

Otra propiedad bioquímica interesante de la molécula MAL es que, como el resto de los miembros de la familia MAL hasta hoy estudiados, fracciona en todos los tipos celulares de forma selectiva en los DRMs (Figura 8B), que se asume que están enriquecidos en las balsas de membrana.

La proteína MAL se expresa no sólo en linfocitos T, donde inicialmente se identificó, sino también en las células epiteliales polarizadas (Figura 8C), como la línea celular MDCK (Zacchetti et al., 1995), oligodendrocitos (Kim et al., 1995) y células de Schwann, que son las células formadoras de mielina en el sistema nervioso central y periférico respectivamente.

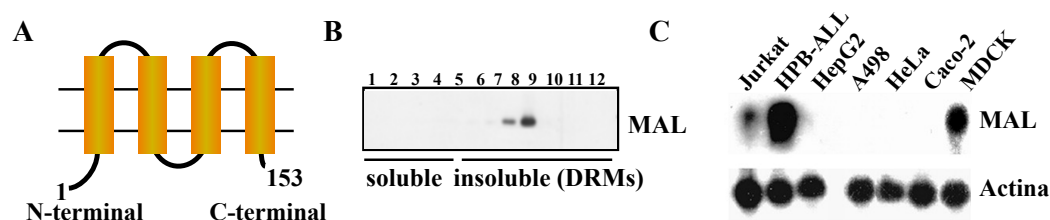


Figura 8. La proteína MAL. (A) Esquema de la estructura propuesta para la proteína MAL. El análisis de su secuencia aminoacídica revela 4 segmentos transmembrana conectados entre sí por bucles hidrofílicos cortos. Los extremos amino y carboxilo están expuestos hacia el citoplasma. (B) En experimentos de lisis celular con detergentes no iónicos a 4°C y centrifugación de equilibrio. MAL se aísla junto con las membranas insolubles en detergente o DRMs. (C) Northern blot que muestra que el gen MAL se expresa en células epiteliales polarizadas (línea MDCK) y en linfocitos T (líneas celulares Jurkat y HPBALL).

3.2 FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA MAL EN LAS CÉLULAS EPITELIALES POLARIZADAS

Debido a que las células MDCK son un modelo celular muy apropiado para el estudio de los procesos intracelulares de transporte, la función de MAL fue inicialmente estudiada en esta línea celular polarizada. La característica fundamental de las células epiteliales es

que presentan dos zonas de la membrana bien diferenciadas morfológica y funcionalmente: la membrana apical y la basolateral. Las observaciones de que: 1) la membrana apical está enriquecida en glicosfingolípidos, 2) Los glicosfingolípidos tienden a autoasociarse y formar agrupaciones insolubles en detergente y 3) algunas proteínas apicales como la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe adquiere insolubilidad durante su transporte biosintético hacia la membrana, llevaron a postular un modelo, según el cual los glicosfingolípidos se agruparían en el TGN y podrían actuar como plataformas para la inclusión específica de proteínas destinadas a ser transportadas hacia la superficie apical (Simons and Wandinger-Ness, 1990). El transporte de las proteínas basolaterales, sin embargo, tendría lugar mediante interacciones proteína-proteína entre señales peptídicas presentes en su tallo citoplásmico y adaptadores de cubiertas vesiculares, y no podrían acceder a estos microdominios, siendo por lo tanto excluidas de las vesículas con destino hacia la superficie apical. Se postuló hace años que, de forma similar al transporte basolateral, se necesitaría una maquinaria proteica especializada cuya función sería captar moléculas carga, interaccionar con la membrana receptora y fusionar las vesículas con la membrana apical.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio y en el del Dr. K. Simons (Instituto de Biología Molecular y Genética Max Planck, Dresde, Alemania), han demostrado un papel esencial de la proteína MAL como integrante de la maquinaria de tráfico apical (Cheong et al., 1999; Martin-Belmonte et al., 2000b; Puertollano et al., 1999) (Figura 9). En células MDCK con niveles reducidos de proteína MAL, el transporte apical se paraliza y el cargo queda retenido intracelularmente. Este bloqueo se correlaciona estrictamente con un impedimento de las proteínas cargo a asociarse con las DRMs (Martin-Belmonte et al., 2000a; Puertollano et al., 1999).

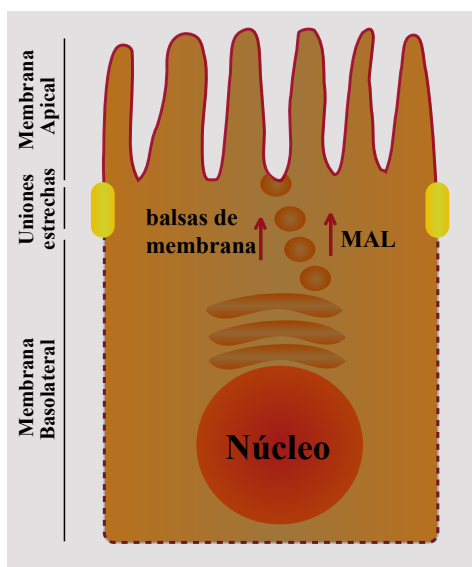


Figura 9. Función propuesta para MAL en células epiteliales polarizadas. Las células epiteliales polarizadas presentan dos dominios diferentes, el apical y el basolateral. Las membranas de ambos dominios muestran distinta composición proteica y están separadas entre sí por uniones estrechas. El tráfico proteico a ambos dominios está regulado. Se ha implicado a MAL como parte de la maquinaria de transporte proteico especializado hacia la membrana apical, proceso en el que también han sido implicadas las balsas de membrana.

Estudios posteriores demuestran que MAL es una molécula dinámica que circula entre el aparato de Golgi, donde recoge la carga, y la membrana plasmática, donde la entrega (Puertollano and Alonso, 1999).

El extremo carboxilo de la molécula MAL (FSLIRWKSS) tiene una secuencia peptídica que se asemeja a varias señales conocidas de “sorting”. Se demostró que la secuencia RWKSS se necesita intacta para que la proteína MAL pueda ejercer su función en el transporte apical (Puertollano et al., 2001).

3.3 MAL EN LINFOCITOS T

El linfocito T es la célula donde se clonó originalmente el ADN de *MAL*. A pesar de ello, el linfocito T no ha sido la célula donde se comenzó estudiando la función de la proteína MAL, debido, quizás en parte, a que su pequeño tamaño no le permite constituir un buen modelo de biología celular. No obstante, los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio establecieron que MAL fraccionaba con los DRMs en linfocitos T (Millan et al., 1997b) junto con la quinasa Lck y otras proteínas asociadas a estos microdominios como CD59 (Millan and Alonso, 1998). De esta manera, quedó establecido que la proteína MAL forma parte de las balsas de membrana en los linfocitos T, pero no se esclareció cuál es la función que desempeña en este tipo celular.

Al contrario con lo que ocurre en linfocitos T humanos, los linfocitos T de ratón no expresan el gen de *MAL*.

4 LA LÍNEA CELULAR JURKAT COMO MODELO DE LINFOCITO T

4.1 LA LÍNEA CELULAR JURKAT Y SUS MUTANTES

La línea celular Jurkat fue generada a partir de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de un niño de 14 años con leucemia T (Schneider et al., 1977). Se demostró que era positiva para marcadores de células T, y posteriormente, se validó como modelo de célula T por su capacidad de producción de interleuquina-2 (IL-2) tras su estimulación con fitohemaglutinina y concanavalina A (Gillis and Watson, 1980). En el laboratorio del Dr. A. Weiss (Howard Hughes Medical Institute, University of California San Francisco, USA) se aisló el clon Jurkat E6.1 que es el modelo celular más utilizado para el estudio del proceso de activación del linfocito T.

En comparación con un linfocito T primario, las células Jurkat son deficientes en la expresión de las fosfatasa lipídicas PTEN y SHIP, por lo que estas células presentan una activación constitutiva de la PI3K debido a los altos niveles de PI(3,4,5)P(3) (Freeburn et al., 2002; Shan et al., 2000). Este hecho hace que los resultados que se obtengan en esta línea celular tienen que ser siempre corroborados con células T primarias.

A partir de la línea celular Jurkat original se han derivado diversos mutantes, carentes de la expresión de ciertas proteínas que fueron identificadas *a posteriori* como necesarias para la activación del linfocito T. Así por ejemplo, las células JCAM1.6 (deficientes en la expresión de Lck), JCAM2 (deficientes en LAT) o las P116 (carentes de ZAP-70) fueron muy útiles para averiguar la función que desempeñaban estas moléculas en la cascada de activación del linfocito T (Arpaia et al., 1994; Finco et al., 1998; Kabouridis et al., 1997; Williams et al., 1998).

La mayor parte de las células Jurkat son positivas para el subtipo V β 8 de TCR, lo que les confiere la capacidad de respuesta frente al superantígeno E (SEE) de *S. aureus*. Esta característica hace que el sistema de célula Jurkat como célula T y células B Raji como APC haya sido utilizado ampliamente en estudios de formación de la SI y de activación celular.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE CÉLULAS JURKAT (JTIM) DEFICIENTE EN LA EXPRESIÓN DE MAL

Partiendo de la línea celular Jurkat, en el laboratorio del Dr. A. Weiss (University of San Francisco, San Francisco, CA) se obtuvieron una nueva generación de mutantes deficientes en activación. La mutagénesis se realizó utilizando etil-metán-sulfonato como agente mutágeno, y seleccionando los clones que fueron defectivos para la señalización inducida por TCR de manera similar a la descrita anteriormente para otros mutantes (Roose et al., 2003). Uno de los mutantes, denominado JTIM (Jurkat TCR-signalling impaired mutant) fue caracterizado como deficiente en la expresión de la proteína MAL, mediante técnicas de microarrays. Este mutante fue cedido al laboratorio del Dr. Miguel Alonso, donde se confirmó esta deficiencia mediante análisis de Northern blot y PCR cuantitativa (Figura 10).

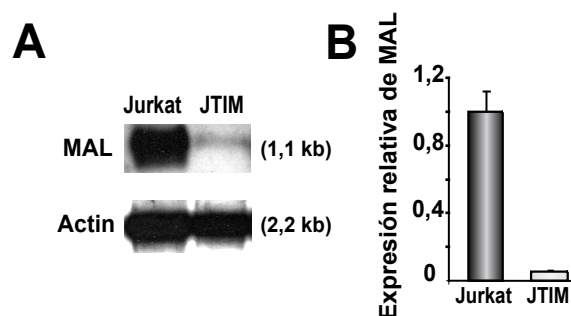


Figura 10. El mutante JTIM no expresa MAL. (A) Northern blot realizado con el ARN extraído del mutante y de células Jurkat control. La hibridación se realizó empleando como sonda el ADNc de MAL. (B) Las mismas muestras fueron sometidas a ensayos de PCR cuantitativa.

A veces, las células JTIM recuperan la expresión de MAL. Esto probablemente ocurre porque se estén produciendo cambios en el estado de metilación del gen de MAL, puesto que tratamientos con el agente metilante 5-aza-2'-deoxicitidina hace que se recobre la expresión de MAL en estas células (Figura 11A), así como ocurre en ciertos tipos de tumores (Lind et al., 2007) (Figura 11B).

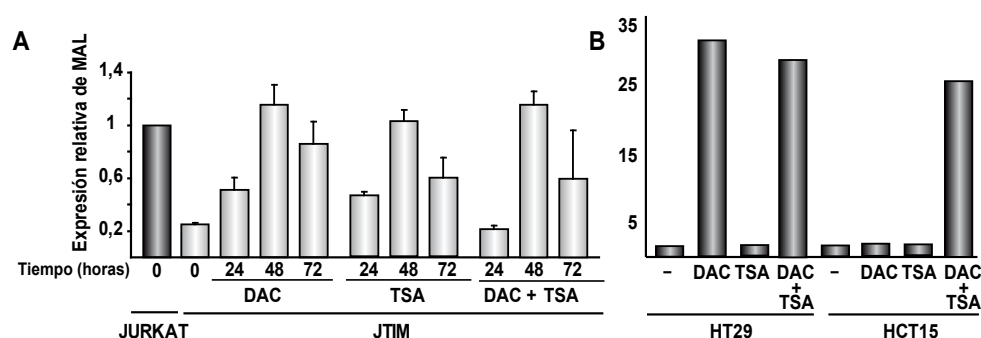


Figura 11. Recuperación de la expresión de MAL en el mutante JTIM. (A) Ensayo de PCR cuantitativa que muestra la recuperación de la expresión de transcritos de MAL en el mutante JTIM en respuesta al tratamiento con 1mM el agente metilante 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC) y 0,5 mM de Tricostatina A (TSA). (B) Experimento de PCR cuantitativa que muestra el aumento de expresión del gen MAL en respuesta al tratamiento con 1mM de DAC, 0,5 mM TSA o con ambas simultáneamente durante 72 h y 12 h respectivamente, en las líneas celulares HT29 y HCT15, de cáncer colorrectal. Gráfico adaptado de Lind et al., 2008.

En una primera caracterización realizada en el laboratorio, el mutante JTIM presentó dos defectos básicos:

- Aunque formaba conjugados con las células Raji con la misma eficiencia que las células Jurkat control, era incapaz de activar las vías AP-1, NFAT, NFκB, y, en consecuencia, es incapaz de activar la transcripción del gen de IL-2 en respuesta a la activación (Figura 12A).
- Era incapaz de formar una sinapsis inmunitaria completa ya que polarizaba actina e ICAM-3 a la SI, pero era incapaz de polarizar TCR, MTOC o PKC-θ (Figura 12B y 12C).

Los defectos de activación podían ser corregidos con la expresión exógena de MAL, lo que indicaba que la deficiencia en la expresión de MAL era el único defecto aparente de las células JTIM.

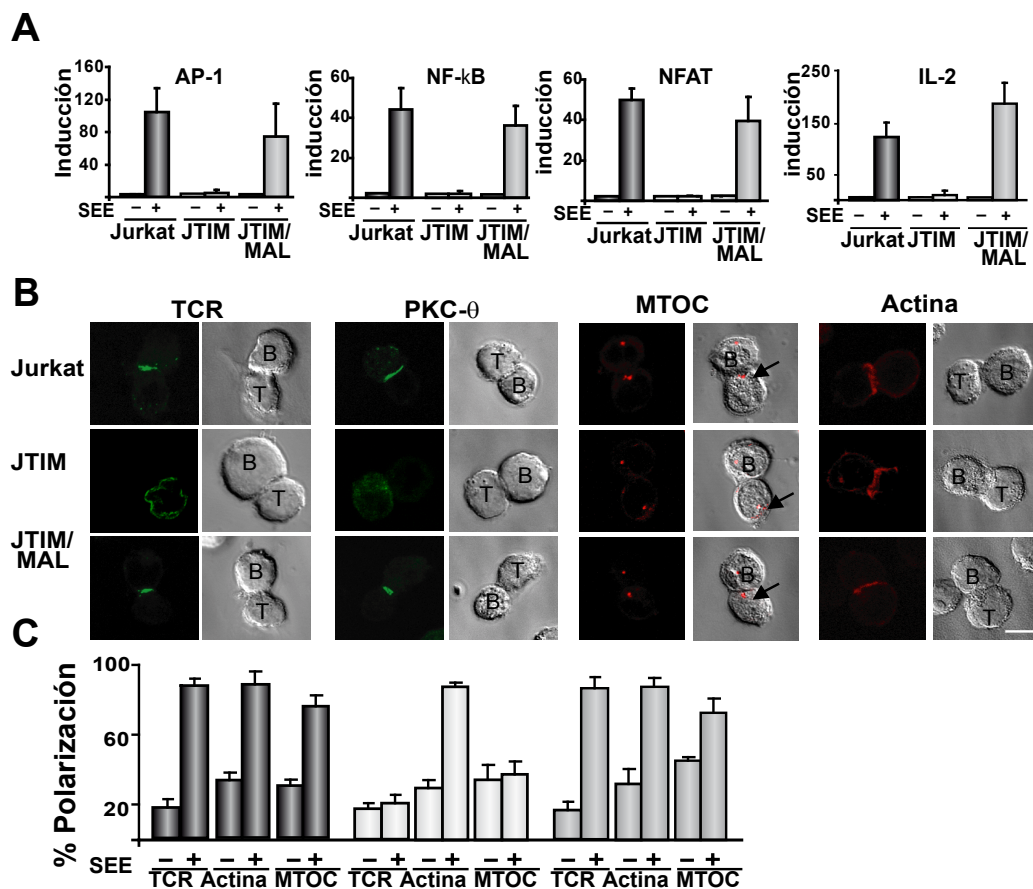


Figura 12. Defectos en la activación del mutante JTIM. (A) El mutante JTIM es incapaz de activar las vías de AP-1, NFAT, NFkB y, en consecuencia, de activar la transcripción del gen de IL-2 en respuesta a la activación. (B) En conjugados célula T-APC, el mutante JTIM no polariza el TCR ni la PKC-θ ni es capaz de reorientar el MTOC (flecha) a la zona de contacto con la célula presentadora. La polarización de actina a la zona de la SI no se ve afectada. La cuantificación de estos experimentos se muestra como histograma en el panel C. Todos los defectos observados en el mutante JTIM fueron corregidos con la expresión exógena de MAL (células JTIM/MAL). Barra, 5 μ m.

Objetivos

OBJETIVOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

1. Estudio de la función de la proteína MAL como posible maquinaria para el transporte especializado de proteínas a la superficie celular en el linfocito T en estado estacionario.
2. Análisis de la distribución, dinámica y función de la proteína MAL durante la formación de la sinapsis inmunitaria, estudiando su posible papel en el ensamblaje de la sinapsis inmunitaria.

Materiales y Métodos

1 MATERIALES

1.1 LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS

- **Jurkat** (línea linfoblastoide T humana)
- **JTIM** (clon celular derivado de células Jurkat que carece de la expresión de la proteína MAL. Fue generada en el laboratorio del Dr. A. Weiss (Howard Hughes Medical Institute, University of California San Francisco, USA))
- **J77** (línea derivada de Jurkat caracterizada por ser homogénea para la expresión del segmento V β 8 del TCR).
- **Raji** (línea celular linfoblastoide B humana)
- **PBLs** (linfocitos T de sangre periférica)
- **CH7C17** (línea linfoblastoide T humana caracterizada por expresar TCR del subtipo V β 3)
- **HOM-2** (línea linfoblastoide B humana)

1.2 ANTICUERPOS

El hibridoma productor de anticuerpos monoclonales de ratón 6D9 (anti-MAL humano), utilizado en ensayos de inmunotransferencia, fue generado en nuestro laboratorio (Millan and Alonso, 1998).

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de ratón L5.1 (anti-TfR, IgG1), 9E10 (anti-myc, IgG1) y OKT3 (anti CD3 ϵ , IgG2a) utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia fueron adquiridos a la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA).

El anticuerpo policlonal de conejo 488 (anti-CD3 ξ) y el anticuerpo monoclonal Apa1.1 (anti CD3 ϵ) utilizados en experimentos de inmunotransferencia, fueron cedidos generosamente por el Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España).

Para ensayos de activación de linfocitos T, se empleó en anticuerpo monoclonal de ratón UCHT1 (anti-CD3 ϵ , IgG1) que fue cedido por el Dr. P. Beverley (Edward Jenner Institute, Bershire, Reino Unido).

El anticuerpo policlonal de conejo 701 (anti-ZAP-70) utilizado tanto en ensayos de inmunofluorescencia como en ensayos de inmunotransferencia, fue donado por el Dr. O. Acuto (Institute Pasteur, París, Francia).

Para detectar la quinasa Lck se emplearon distintos anticuerpos: en ensayos de inmunofluorescencia, se utilizaron indistintamente un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG2a) de Transduction Laboratories (Lexington, KY) y otro policlonal de conejo donado por el Dr. A. Veillette (McGill University, Montreal, Canadá); para ensayos de inmunoprecipitación, se

usaron anticuerpos policlonales de conejo adquiridos a Cell Signalling (Beberly, MA) y BD Biosciences (San Jose, CA).

Los anticuerpos monoclonales de ratón HP2/19.1.1 (anti-ICAM3, IgG2a), TS1.11 (anti-LFA-1, IgG1), HP26/1.1 (anti-CD4, IgG2a) utilizados en inmunofluorescencia, fueron cedidos generosamente por el Dr. F. Sánchez-Madrid (Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España).

Como controles del aislamiento de las fracciones de membrana insolubles en detergente se emplearon, en ensayos de inmunotransferencia, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TfR (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) y el anticuerpo monoclonal de ratón MEM 43/5 (anti-CD59, IgG2a) cedido amablemente por el Dr. V. Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Prague, República Checa).

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-PLC γ (IgG1), anti-ZAP-70 y anti-PKC- θ utilizados en ensayos de inmunofluorescencia e inmunotransferencia, son de Transduction Laboratories (Lexington, KY).

El anticuerpo policlonal de conejo anti-Erk total empleado en ensayos de inmunotransferencia, procedió de Cell Signalling (Beberly, MA). El policlonal de conejo anti-fosfo-Erk fue adquirido a Promega (Madison, WI).

Los anticuerpos monoclonales de ratón GTU88 (anti- γ tubulina, IgG1), anti-FLAG (IgG1) y el policlonal de conejo anti-FLAG fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

El anticuerpo policlonal de conejo anti-LAT empleado en técnicas de inmunofluorescencia e inmunotransferencia fue adquirido a Millipore (Billerica, MA).

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD3 acoplados a los fluoróforos APC y FITC, anti fosfo-ERK-FITC, anti-CD4 murino, anti-CD19, anti-V β 8 y anti-CD69, estos últimos acoplados al fluoróforo ficoeritrina (PE), empleados en ensayos de citometría de flujo, se compraron a BD Biosciences (San Jose, CA).

El anticuerpo monoclonal de rata anti-CD4 murino empleado en ensayos de inmunofluorescencia fue cedido amablemente por el Dr. JM. Rojo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España).

Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HPR) empleados en inmunotransferencia fueron adquiridos a Pierce (Rockford, IL).

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos Alexa fueron adquiridos a Molecular Probes (Eugene, OR).

La faloidina acoplada a Alexa 488, Alexa 647 o TRITC, así como los anticuerpos anti-GFP fueron obtenidos de Invitrogen.

1.3 **REACTIVOS**

La solución comercial separadora de linfocitos (densidad 1,077 g/ml) que se empleó para aislar los PBLs es de Cora (Comercial Rafer, Zaragoza, España).

Las sondas fluorescentes CMAC (Chloromethyl derivate of aminocoumarin) y CMTMR (chloromethylbenzoylaminotetramethylrhodamine) son de Molecular Probes (Eugene, OR).

Los superantígeno SEE y SEB necesarios para los experimentos de conjugación de linfocitos T con las células presentadoras fueron suministrados por Toxin Technology (Sarasota, FL).

La poli(L)lisina y la fibronectina utilizadas para adherir los linfocitos al sustrato, la γ -globulina empleada para bloquear los receptores Fc de las células Raji, la formalina utilizada para fijar las células y la geneticina (G418) y puromicina empleadas como antibióticos de selección de clones establemente transfectados son productos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

El medio de montaje Fluoromont G se compró a Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL).

Las membranas Immobilon-P y nitrocelulosa utilizadas para ensayos de inmunotransferencia son productos de Millipore (Bedford, MA).

Los marcadores preteñidos así como la solución de acrilamida-bisacrilamida utilizados para la electroforesis en geles de poliacrilamida fueron proporcionados por Bio-Rad.

1.4 **PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS**

Las construcciones de MAL utilizadas en los experimentos son las siguientes:

- MAL: ADNc de la molécula MAL clonado en el vector pCR3.1 bajo el control del promotor CMV (citomegalovirus). Contiene el gen de resistencia a geneticina.
- myc/MAL (Millan et al., 1997): ADNc de la molécula MAL clonada en el plásmido pCR3.1, que expresa el epítipo myc en el extremo amino terminal de la molécula MAL.
- MAL/FLAG (Puertollano and Alonso, 1999): ADNc de MAL con el epítipo myc en su extremo amino terminal y el epítipo FLAG en el último bucle extracelular.
- GFP/MAL (Martin-Belmonte et al., 2003): ADNc de la molécula MAL clonada en el plásmido GFP-C1 (Clontech). Expresa un quimera de la proteína MAL con la proteína GFP en su extremo amino terminal.
- Cherry/MAL: ADN copia de la molécula MAL clonada en el plásmido mCherry C1 (Clontech).

Las construcciones fusión a GFP empleadas en experimentos de microscopía y citometría de flujo son las siguientes:

- Lck-GFP: ADNc de la quinasas Lck clonado en el plásmido GFP-N1 (Clontech).
- L₁₀-GFP (Van Komen et al., 2007): construcción que expresa los 10 primeros aminoácidos de la Lck fusionados a GFP, fue proporcionada por el Dr. V. Rodgers (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK).
- LAT-GFP: ADNc del adaptador LAT clonado en el plásmido GFP N1 (Clontech).
- CD4 δ cyt-GFP (Krummel et al., 2000): construcción que codifica para los aminoácidos correspondientes al fragmento extracelular y transmembrana de la molécula CD4 de ratón. Fue donada por el Dr. M. Krummel (University of San Francisco, San Francisco, CA).
- p75-GFP (Kreitzer et al., 2000): cedida por el Dr. E. Rodriguez-Boulan (Cornell University, Ithaca, NY).
- Fyn-GFP (Kasahara et al., 2007): donada por el Dr. N. Yamaguchi (Chiba University, Chiba, Japan).

La quimera CD4/Lck fue descrita previamente (Xu and Littman, 1993). Para generar la quimera LAT/Lck, se utilizó un oligonucleótido que contenía los 108 nucleótidos correspondientes al fragmento extracelular y transmembrana de la proteína LAT humana, a los que se les añadieron las secuencias que codifican para el epítipo myc en su extremo aminoterminal, y las dianas de restricción para EcoRI y XhoI en los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente. Éste se apareó con otro oligonucleótido complementario. Esta secuencia de doble cadena sustituyó a la secuencia del ADNc de CD4 de la quimera CD4/Lck. Ambas construcciones fueron posteriormente subclonadas en el plásmido pCR3.1.

Las construcciones utilizadas para silenciar la expresión de MAL se han basado en el plásmido pSuper (Brummelkamp et al., 2002) (Figura 13). A partir del promotor H1 (específico de la ARN polimerasa III), se genera una única molécula de ARN que se pliega sobre sí misma para generar una estructura de doble cadena. Las secuencias clonadas en este plásmido fueron 5'-TCATGGCCCCCGCAGCGGC-3' y 5'-GGGAGCTTGCTGTGTCTAA-3', que tienen como diana las secuencias que rodean el codón AUG de iniciación y la región 3' no traducida del ARNm de MAL respectivamente, separadas por el espaciador 5'-TTCAAGAGA-3' de su secuencia complementaria, generándose así los que se llamaron shARN1 y shARN2. Estos plásmidos fueron modificados posteriormente mediante la inserción de un fragmento de ADN que contenía la secuencia de la proteínas GFP o Cherry bajo el promotor de CMV, lo

cual nos facilitaba la identificación de las células transfectadas generándose así los plásmidos pSupersshMAL/GFP (Figura 13).

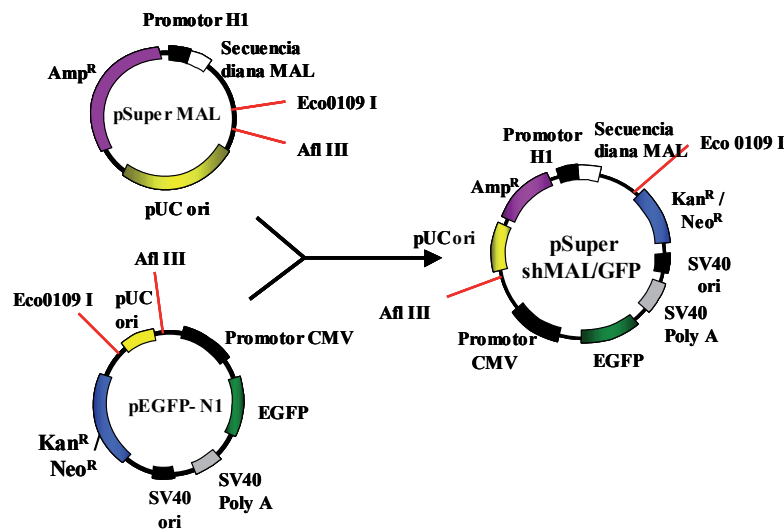


Figura 13. Esquema del plásmido pSuper shMAL/GFP. Esquema que muestra los pasos seguidos para la construcción del plásmido recombinante pSuper shMAL/GFP.

2 MÉTODOS

2.1 CULTIVOS CELULARES

Las células fueron crecidas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero de ternera fetal (Sigma-Aldrich), 10 mM Glutamina, 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina, a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂, 95% aire.

2.2 EXPERIMENTOS DE CONJUGACIÓN

Las células B Raji, que fueron utilizadas como células presentadoras (APCs), fueron previamente incubadas con el antígeno adecuado a una concentración final de 4 µg/ml en medio de cultivo completo. Tras 30 minutos a 37°C, fueron añadidas sobre las células T en proporción 1:1. Posteriormente, se dejó que las células se adhirieran sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina y se fijaron con formalina a temperatura ambiente o metanol a -20°C. El tiempo de conjugación varía y se especifica según el experimento.

Para ciertos los experimentos de activación, tanto las células T como las B fueron previamente ayunadas en RPMI sin suero durante al menos 1 h a 37°C.

Para otros experimentos se utilizaron las células Jurkat CH7C17, que expresan un TCR subtipo Vβ3 específico para HA. Estas células fueron conjugadas con las células presentadoras HOM-2 en presencia de 200 µg/ml del péptido 307-319 de HA

(PKYVKQNTLKLAT) o de un péptido control (PKYVKQNTLELAT), o 2 µg/ml de SEB. La conjugación se realizó durante 15 minutos, procediendo de manera análoga a los descrito para el caso de los conjugados de células Jurkat.

2.3 ANÁLISIS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Se parte de células adheridas a cubreobjetos y fijadas, bien con formalina o bien con metanol. Las fijadas durante 15 minutos con formalina a temperatura ambiente fueron posteriormente tratadas durante 5 minutos con glicina 10 mM en PBS, para bloquear los grupos aldehído libres, y permeabilizadas o no con Tritón X100 (0,2%) durante 3-5 minutos a 4°C. Posteriormente, estos cristales fueron bloqueados con PBS, 3% BSA, γ globulina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados (en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C) y se montaron en portaobjetos de cristal usando el medio de montaje Fluoromont G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL).

Las preparaciones fueron analizadas mediante sistema de microscopía confocal, usando los equipos disponibles: Confocal LSM510 Meta (Zeiss), Confocal LSM510 Invertido (Zeiss) y Confocal LSM510 Vertical (Zeiss). Las imágenes adquiridas fueron procesadas con los programas LSM 5 Image Browser, Adobe Photoshop CS1 y montadas en Adobe Illustrator 10.

2.4 VIDEOMICROSCOPIA

Estos experimentos se realizaron en placas de cultivo especiales, que poseen un cubreobjetos de vidrio en el fondo. Estas placas fueron pretratadas con fibronectina a 20 µg/ml durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, fueron bloqueadas incubándolas durante 30 minutos con HBSS (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, 10 mM glucosa, 10 mM Hepes, pH 7,4) al 1% de suero a 37°C. Para este tipo de experimentos, se emplearon clones establemente transfectados con proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes (GFP o Cherry), o bien se transfectaron transitoriamente las células y se dejó expresar la proteína de fusión durante 24 h.

Las células T se resuspendieron en medio HBSS al 3% de suero y 20 mM Hepes a una concentración de 3×10^5 células/ml. 300 µl de esta suspensión de células fueron añadidos sobre las placas ya bloqueadas, que se dejaron durante 15-20 minutos a 37°C para facilitar la adhesión de los linfocitos T al cubreobjetos de la placa.

Las células presentadoras (Raji) se marcaron con una sonda fluorescente para poder distinguirlas de las células T. Para ello, se resuspendieron a una concentración de 3×10^6 células/ml en RPMI sin suero, y se incubaron 30 minutos a 37°C en presencia de las sondas CMAC (excitación a 353 nm, emisión a 466 nm), a 10 µM, o CMTMR (excitación a 541 nm,

emisión a 565 nm) a 5 μ M. Posteriormente, se eliminó la sonda que no había penetrado en las células lavando con RPMI al 5% de suero. Finalmente, se resuspendieron las células Raji ya marcadas en el mismo medio el que previamente se había resuspendido las células T (HBSS al 3% de suero y 20 mM Hepes), y se añadieron sobre éstas. Para ciertos experimentos, se emplearon células Raji que expresaban establemente la proteína GFP. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal LSM Meta, manteniendo temperatura, humedad y CO₂ constantes (37°C, 5% CO₂), y analizadas con los programas Metamorph e ImageJ.

2.5 TRANSFECCIÓN

Para la transfección transitoria, las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^7 células/ml en RPMI completo al 20% de suero. 500 μ l de esta suspensión se mezclaron con 40 μ g del ADN plasmídico correspondiente y se añadieron en una cubeta de Biorad de 0,45 μ m. La transfección se realizó mediante electroporación en un electroporador de BioRad con condiciones de 264 V 975 μ F.

Las condiciones para la transfección estable varían ligeramente, puesto que las células son resuspendidas en RPMI sin suero y son electroporadas a 260 V y 960 μ F.

2.6 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para los experimentos de análisis de la activación mediante la expresión en membrana de CD69, las células T fueron resuspendidas en placa de 96 pocillos a una concentración de 5×10^5 células/100 μ l RPMI completo y activadas con anticuerpos (OKT3 o UCHT1, a 5 μ g/ml), células presentadoras, en presencia o ausencia de SEE o PMA (50 ng/ml). La expresión de CD69 se midió a las 16 h post-estimulación.

Para la tinción de la proteína se empleó un anticuerpo acoplado directamente al fluoróforo PE (ficoeritrina). Las células fueron incubadas con el anticuerpo durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Una vez teñidas, se lavaron varias veces, se resuspendieron en 500 μ l de PBS/BSA al 1% y se analizaron en el equipo de citometría de flujo FACScalibur (BD Biosciences) con el programa Cell Quest Pro. Las representaciones y el análisis estadístico se realizó con el programa FlowJo.

Para los experimentos de endocitosis y degradación del TCR, se procedió a estimular las células del mismo modo que en el caso anterior, pero se analizaron a distintos intervalos de tiempo, hasta un máximo de 5 h post-estimulación. En este caso, se procedió a fijar las células en tampón de fijación (paraformaldehído al 2% en PBS, pH 7,2) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas o no en tampón de permeabilización PBS, 1% BSA 0,2% saponina 0,01% NaN₃ durante 20 minutos a 4°C. Los siguientes pasos (incubación con el/los anticuerpo/s adecuados y análisis del resultado) se hicieron de manera análoga al caso anterior. Para poder distinguir las células presentadoras de las T, se emplearon Raji que expresaban establemente la proteína GFP.

La única variante de este protocolo se empleó en el caso del análisis de fosfo-ERK, donde la fijación se realizó durante 10 minutos a 37°C y la permeabilización con metanol al 90% en PBS durante 30 minutos en hielo.

2.7 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS INSOLUBLES EN DETERGENTE (DRMs)

Para el aislamiento de las fracciones insolubles en detergente se utilizó la centrifugación de equilibrio en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa (Millan et al., 2003). Para ello partimos de 3×10^7 células, crecidas a una concentración aproximada de 5×10^5 células/ml. A continuación, se lavaron con PBS y se lisaron durante 30 minutos a 4 °C en el tampón de lisis TN (25 mM Tris-HCl pH7,4; 150 mM NaCl y TX-100 al 0,2%) suplementado con inhibidores de fosfatasa (25 μ M NaF, 1mM ortovanadato sódico, 1 mM ácido okadaico, 10 mM β -glicerofosfato) e inhibidores de proteasas (100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml aprotinina y 1 μ g/ml pepstatina A). La lisis se realizó empleando una relación de 10 μ l de tampón de lisis/ 1×10^6 células. Tras 30 minutos de incubación, se homogeneizó el lisado pasándolo 5 veces por una aguja de tamaño 22-G y se mezcló con solución de sacarosa al 70%, quedando a una concentración aproximada del 40%. Este extracto se situó en el fondo de un tubo de ultracentífuga Beckman de 4 ml de capacidad. Sobre él se situaron 3 ml de una solución de sacarosa al 30% y 1ml de otra solución de sacarosa al 5%, con especial cuidado de mantener intactas las interfases entre las capas de sacarosa de distinta densidad. La muestra se sometió a ultracentrifugación de equilibrio (20 h) a 4°C y 53.000 rpm en un rotor flotante Beckman TST60.4.

Se recogieron 0,5 ml de la fracción insoluble (interfase entre las capas de sacarosa del 5% y del 30%), donde flotan las membranas insolubles, y 0,5 ml de la fracción soluble (fondo del tubo). A la fracción insoluble se le añadió N-octyl-glucósido a una concentración final de 60 mM, para solubilizar los rafts presentes.

A partir de estas muestras, se procedió bien a su análisis mediante electroforesis e inmunotransferencia, o bien fueron sometidas a inmunoprecipitación con los anticuerpos apropiados (Figura 14).

2.8 ELECTROFORESIS E INMUNOTRANSFERENCIA

Las muestras fueron mezcladas con tampón Laemmli 2X (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 25% glycerol, 0,01% bromophenol blue) con o sin 10% β -mercaptoetanol y hervidas durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (Biorad) en presencia de SDS. El porcentaje de acrilamida utilizado fue el adecuado para resolver correctamente la proteína de interés según su peso molecular. Posteriormente, las proteínas resueltas en la electroforesis se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore). Después de

bloquear con leche al 5% en PBS, Tween-20 al 0,2%, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo adecuado durante 1 h a temperatura ambiente. Después de varios lavados, se incubó la membrana durante 30 min con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y revelado por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (GE Healthcare).

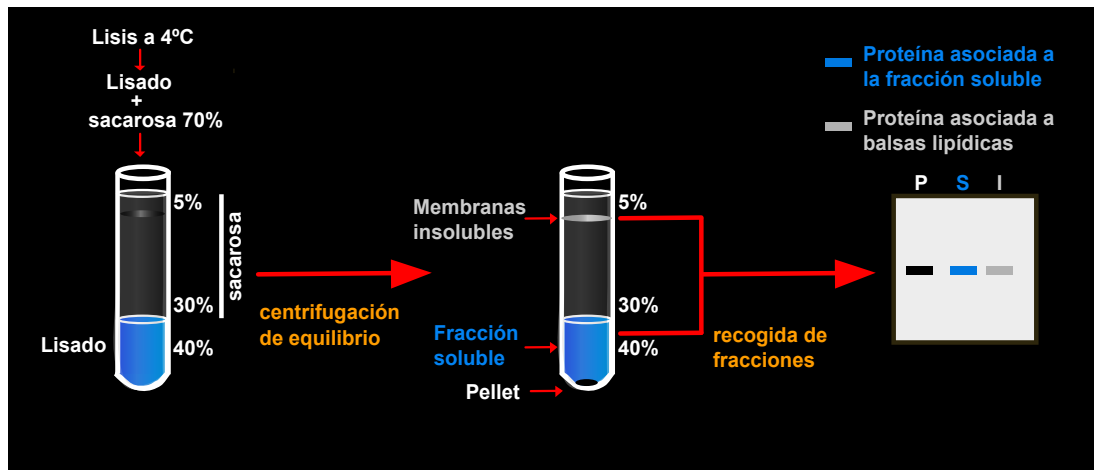


Figura 14. Aislamiento de las balsas de membrana. Esquema en el que se representa el aislamiento de las balsas de membrana mediante lisis celular en detergentes no iónicos (TX-100) a 4°C y posterior ultracentrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de sacarosa. El análisis del experimento se realiza por inmunodetección de una alícuota de cada una de las diferentes fracciones aisladas del gradiente. S, fracción soluble, donde se concentran todas la mayoría de las proteínas citoplasmáticas y nucleares, así como aquellas de membrana que han sido solubilizadas durante la extracción; I, fracción insoluble o DRMs, donde se concentran las proteínas asociadas a las membranas resistentes a la solubilización; P, pellet, que contiene células que no han sido lisadas, núcleos y citoesqueleto.

2.9 INMUNOPRECIPITACIÓN

Para los estudios de inmunoprecipitación, las células (3×10^7 células por punto) se lisaron en 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, en presencia de inhibidores de fosfatasas y proteasas. El lisado fue preaclorado durante 1 h con proteína G-Sefarosa unida a un anticuerpo control, centrifugados, y el sobrenadante incubado con el anticuerpo específico durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se añadió proteína G-Sefarosa y se incubó la mezcla durante 1 h a 4°C. Los complejos inmunoprecipitados fueron recogidos por centrifugación, lavados repetidamente y analizados mediante inmunotransferencia con los anticuerpos apropiados.

La única variante de este protocolo se realizó en los ensayos de activación celular, en los cuales se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. En este caso, el anticuerpo anti-fosfotirosina se compró directamente unido a bolas de agarosa. Para estos experimentos, el preaclorado se llevó a cabo incubando el lisado con proteína G-Sefarosa, y para la inmunoprecipitación específica, bastó con 1 h de incubación a 4°C con las bolas de anticuerpo anti-fosfotirosina acoplado a agarosa.

2.10 EXPERIMENTOS DE PULSO Y CAZA

Se sembraron las células en frascos de cultivo a una concentración de 5×10^5 células/ml. Se mantuvieron ayunadas de suero durante 3-4 h y finalmente se las resuspendió en 1 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) completo al 5% de suero y 1 mCi de $[S^{35}]$ -metionina/cisteína. El tiempo del pulso de metionina radiactiva fue de 15 min. Pasado este tiempo, se substituyó el medio radiactivo por medio normal. La “caza” se hizo a 15 y 45 min. Pasado este tiempo, se lavaron las células con PBS y se siguieron dos protocolos diferentes: por un lado se aislaron las membranas insolubles en detergente, procediendo del modo anteriormente descrito, y por otro lado, se aislaron las membranas completas.

A partir de 500 μ l de las fracciones soluble e insoluble aisladas de los gradientes de ultracentrifugación, se procedió a inmunoprecipitar Lck empleando 5 μ g de anticuerpo policlonal de conejo unido a proteína A-Sefarosa. La inmunoprecipitación se realizó de la manera indicada en el epígrafe 2.8.

Para aislar las membranas celulares, se empleó la lisis en medio hipotónico (Bijlmakers and Marsh, 1999). Para ello, las células fueron incubadas en 1 ml de tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 2mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF en hielo durante 12 minutos y pasadas 5 veces por una aguja 22G. Para retirar los núcleos, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. El sobrenadante postnuclear fue de nuevo centrifugado durante 45 minutos a 100.000 xg a 4°C. El sedimento de membranas fue resuspendido en 500 μ l tampón hipotónico ajustado a 2% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF. La fracción soluble (500 μ l) fue también ajustada a 2% NP-40 y 150 mM NaCl. Finalmente, y de manera análoga al caso anterior, se inmunoprecipitó Lck de ambas fracciones.

Las muestras fueron finalmente analizadas por autorradiografía para detectar la Lck sintetizada durante el pulso radiactivo, así como por inmunotransferencia, para detectar las cantidades totales de Lck inmunoprecipitada.

2.11 AISLAMIENTO Y TRANSFECCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA (PBLs)

Se tomó una muestra de sangre de un donante sano, la cual se depositó en un tubo sobre un colchón de solución separadora de linfocitos (Cora, Comercial Rafer), con cuidado de mantener intacta la interfase entre ambos fluidos. Se centrifugó durante 40 minutos a temperatura ambiente a 700 xg. Una vez finalizada la centrifugación, se recogieron las células presentes en la interfase (linfocitos y monocitos), que quedaban así separadas de los glóbulos rojos, depositados en el fondo del tubo (capaces de atravesar el colchón de solución separadora). Las células recogidas se lavaron dos veces con PBS, y se sembraron en placas de cultivo con RPMI completo al 10% de suero. Transcurridas unas dos horas, se recogió

el sobrenadante de estas placas (donde se concentraban los linfocitos) y se desecharon las células adheridas (monocitos).

La transfección de los PBLs se hizo mediante electroporación (Nucleofector, Amaxa), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para transfectar linfocitos primarios (1×10^7 células en 500 μ l de solución Human T-Cells , 10 μ g de ADN y programa U16). Se dejó que los PBLs expresaran el ADN transfectado durante 24-48 h y, posteriormente, fueron sometidos a experimentos de conjugación y análisis de inmunofluorescencia.

Resultados

RESULTADOS

1. La proteína MAL es necesaria para la formación de la SI

Los experimentos previos realizados con el mutante JTIM, demostraron que la proteína MAL es necesaria para la formación de una sinapsis inmunitaria normal (Anton et al., 2008). La polarización de moléculas tales como CD3, LFA1 o de estructuras como el MTOC resultaba afectada en ausencia de la proteína MAL endógena. Para confirmar mediante una técnica independiente que la falta de expresión de MAL afecta a la formación de la SI, se utilizó un vector (pSupershMAL/GFP) a partir del cual se transcribe un shARN específico para silenciar la expresión de MAL. Para estos experimentos se expresaron dos tipos de shARN, uno dirigido contra una región complementaria al codón AUG inicial y las secuencias 5' y 3' adyacentes (shARN1) y otro dirigido contra la región 3' no traducida (shARN2) del ARNm de la proteína MAL humana. El plásmido pSuper donde se clonaron las secuencias correspondientes expresa la proteína GFP desde un promotor independiente, lo que nos permitió identificar las células transfectadas.

El efecto obtenido con los shARN1 y shARN2 sobre los niveles de expresión de la proteína MAL se estudió mediante inmunotransferencia. Para ello se transfectaron células Jurkat con un plásmido que expresaba un shARN control y con los plásmidos que expresaban los shARN 1 y 2. Tras 48 h de expresión, se separó la subpoblación de células que expresaban GFP, y por tanto, que contenían el plásmido de interés, en un separador celular (FACS Vantage SE, BD Biosciences). La suspensión celular obtenida de la separación fue lisada, y el lisado se sometió a centrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de sacarosa para separar los DRMs. Finalmente, se tomaron alícuotas de las distintas fracciones (S, fracción soluble; I, fracción de DRMs) y la expresión de MAL fue analizada mediante inmunotransferencia. La figura 15A muestra que ambos shARN silenciaron eficientemente la proteína (aproximadamente un 71% el shARN1 y un 70% el shARN 2).

Para comprobar si el efecto de la ausencia de MAL en la formación de la sinapsis inmunitaria observado en las células JTIM era extensible a otros sistemas celulares distintos y a otros antígenos distintos del SEE, se empleó una variante derivada de células Jurkat denominadas Jurkat CHC17. Estas células poseen un TCR que responde tanto a la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB) como al péptido 307-319 de la proteína hemaglutinina (HA) del virus influenza. Como APCs se emplearon la línea Raji y la línea celular HOM-2, como presentadoras del SEB y del péptido de HA respectivamente. La figura 15B muestra que los resultados obtenidos con SEB y HA al conjugar las células fueron semejantes a los obtenidos con SEE y también que el silenciamiento de la proteína MAL endógena disminuye el porcentaje de células que polarizan el TCR hacia la zona de contacto con la APC (histograma de la figura 15B).

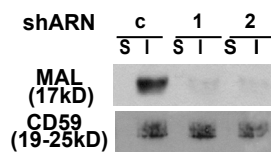
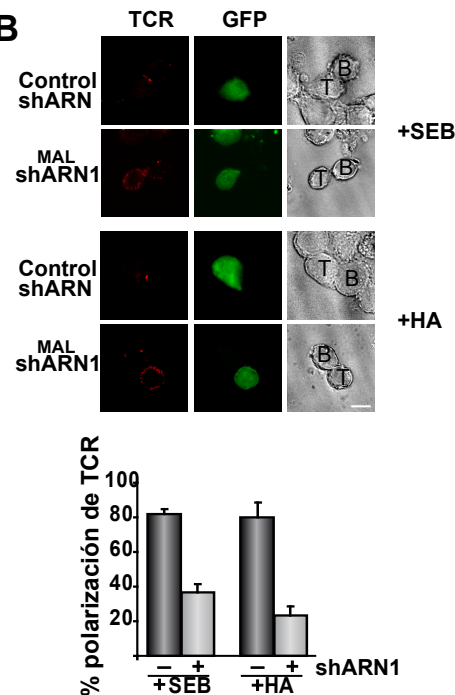
A**B**

Figura 15. Efecto del silenciamiento de MAL sobre la formación de la SI. (A) Immunodetección de la proteína MAL en células Jurkat control y silenciadas mediante expresión transitoria de los plásmidos pSupershMAL/GFP 1 y 2. Tras 48 h, se separaron las células que expresaban GFP, y por tanto, el shARN para MAL, se lisaron, y el lisado fue analizado por inmunotransferencia. S, fracción soluble del gradiente, I, fracción insoluble o DRMs. (B) En experimentos de conjugación de las células silenciadas de MAL, se observa cómo el TCR no es reclutado a la zona del contacto con la APC, ni en presencia de SEB ni de péptido de HA. El histograma muestra la cuantificación del experimento, poniendo de manifiesto cómo la ausencia de MAL afecta a la polarización del TCR en ambos sistemas de presentación antigénica. Barra, 5 μ m.

2. La proteína MAL es necesaria para el transporte de la tirosina-quinasa Lck a la membrana plasmática

Dado el papel que la proteína MAL desempeña en el tráfico de ciertas proteínas de membrana en células epiteliales (Cheong et al., 1999; Martin-Belmonte et al., 2000; Puertollano et al., 1999) pensamos que era muy posible que MAL tuviera una función similar en linfocitos T. Como una primera aproximación para detectar defectos en el transporte de proteínas a la superficie celular, comparamos, en células Jurkat y células JTIM la expresión en membrana y distribución de varios tipos de moléculas, algunas excluidas de balsas de membrana (TCR, ICAM-3, CD4, CD28 y LFA-1) y otras incluidas constitutivamente en las mismas (LAT, CD59 y Lck). De todas las moléculas analizadas, sólo en el caso de Lck se observó una diferencia clara de distribución subcelular entre las células Jurkat normales y las deficientes en la expresión de MAL.

Así, en las células Jurkat, Lck se distribuye en la periferia, correspondiendo a la membrana plasmática, e intracelularmente, en un compartimento identificado como endosomas de reciclaje (Ehrlich et al., 2002). Por el contrario, la células JTIM, Lck se

presenta mucho más acumulada en el compartimento intracelular y en niveles bajos en la membrana (Figura 16A). La distribución de esta quinasa vuelve a ser normal en células JTIM reconstituidas por expresión estable de MAL exógeno (células JTIM/MAL). A diferencia de la células Jurkat, los linfocitos T normales en estado estacionario, expresan Lck casi de forma exclusiva en la membrana plasmática (Figura 16B). El silenciamiento de la expresión de MAL en estas células, redujo de forma muy considerable la expresión de Lck en la superficie celular con su consiguiente acumulación intracelular (Figura 16B). En resumen, tanto en células Jurkat como en linfocitos T normales, la expresión de MAL es necesaria para que Lck se localice en la membrana plasmática

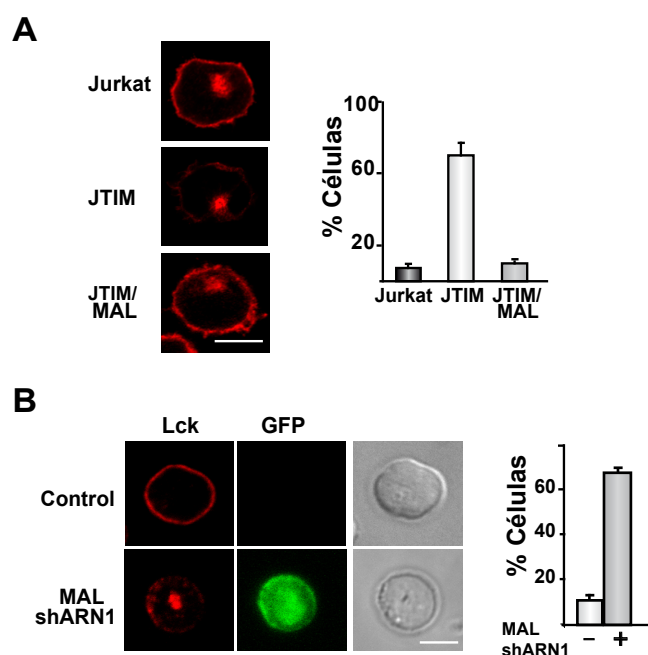


Figura 16. El silenciamiento de MAL afecta a la distribución subcelular de Lck. (A) Las células Jurkat, JTIM y JTIM/MAL, reconstituidas mediante la expresión de MAL exógeno, fueron fijadas y permeabilizadas. La distribución de la Lck endógena se analizó por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico. Para la cuantificación, se ha establecido una relación entre la cantidad de Lck intracelular y en periferia. Se ha asumido como media muestral (m), el valor obtenido en las células Jurkat. Los valores superiores a $m+2SD$ (desviación típica), se han tomado como positivos para células que presentan Lck más retenida intracelularmente. Como se puede observar, el 80% de las células JTIM son positivas según este criterio. (B) Los linfocitos aislados de sangre periférica (PBLs) fueron transfectados con el plásmido pSupersMAL/GFP. Tras 48 h, fueron fijados y permeabilizados. Las células que contenían el shARN de MAL fueron identificadas por la expresión de GFP. La detección de la Lck endógena se hizo mediante un anticuerpo específico. El histograma muestra el porcentaje de células en las que Lck aparece en un compartimento interno. Ambos histogramas representan la media de tres experimentos independientes (40 células/experimento). Barra, 5 μm .

3. La proteína MAL es necesaria para la incorporación de Lck en membranas insolubles

En linfocitos T, la proteína Lck está incluida en las fracciones de membranas insolubles a detergente (Shenoy-Scaria et al., 1993). Para investigar si la falta de expresión de MAL afecta de alguna manera a la inclusión de Lck en estas membranas, se aislaron DRMs de células Jurkat y células JTIM y comparamos la distribución de Lck en las distintas fracciones del gradiente. Mientras que en células Jurkat, aproximadamente un 50% de la Lck aparece asociada a DRMs; esta asociación fue sólo de un 24% en células JTIM (Figura 17A). La inclusión de Lck en DRMs alcanzó niveles normales en las células JTIM reconstituídas con MAL. Como control del experimento, se analizó la distribución de LAT, proteína de presencia exclusiva en DRMs, que no resultó dependiente de la expresión de MAL. La inclusión de CD59 en DRMs tampoco se vio afectada (Figura 15A).

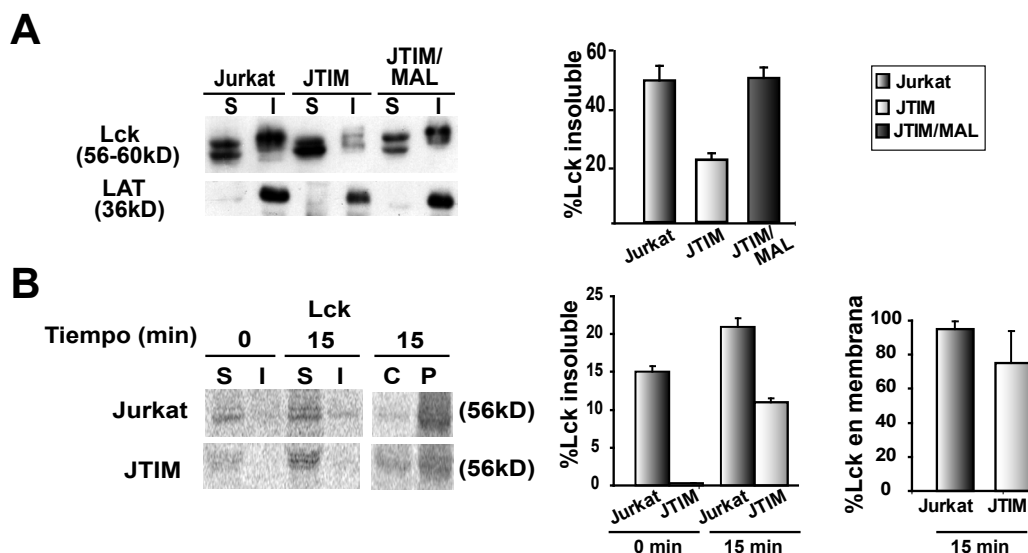


Figura 17. Asociación de la proteína Lck a membranas y DRMs. (A) Inmunodetección de la proteína Lck endógena en un experimento de aislamiento de DRMs. S, fracción soluble del gradiente, I, fracción insoluble. (B) Se dio un pulso de 15 minutos con 1 mCi de [S35]-metionina/cisteína. Tras ese tiempo, se sustituyó el medio con el isótopo por medio no radiactivo y se procedió a la "caza" a los tiempos indicados. A partir de una parte del cultivo, se aislaron DRMs y otras células sirvieron para aislar membranas totales. Se inmunoprecipitó Lck de las distintas fracciones y el resultado se analizó por inmunotransferencia y se reveló por la señal autorradiográfica de la proteína marcada. S, fracción soluble del gradiente, I, fracción insoluble. C, fracción citosólica; P, fracción de membranas. Las barras de los histogramas muestran la desviación estándar.

Ha sido descrito que la quinasa Lck se incorpora a membranas bastante pronto tras su biosíntesis (Bijlmakers and Marsh, 1999). Dado que en ausencia de MAL la Lck aparece más concentrada en la fracción soluble (S) del gradiente (que contiene tanto las proteínas solubles como las proteínas de membrana solubilizadas por el detergente), la siguiente cuestión que nos planteamos fue examinar si la proteína MAL también era requerida para

la incorporación en membranas de la Lck recién sintetizada o sólo para la inclusión de la quinasa en los DRMs. Para ello, realizamos en paralelo experimentos de pulso y caza en células Jurkat y células JTIM. El resultado mostró que, en ausencia de MAL, la quinasa Lck era capaz de incorporarse en membranas después de su biosíntesis, pero no de acceder a los DRMs (Figura 17B). La cuantificación de este experimento se muestra como histograma en la Figura 17B.

4. MAL se asocia con Lck

La observación de que la asociación de Lck con los DRMs correlaciona con la expresión de MAL, nos llevó a examinar si ambas proteínas interaccionaban. Para abordar esta cuestión, realizamos ensayos de coimmunoprecipitación empleando células Jurkat establemente transfectadas con la proteína MAL con un epítipo myc en su extremo amino terminal (myc-MAL) (Figura 18A). La inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-myc arrastró también a la Lck endógena (Figura 18B) revelando la existencia de asociación entre MAL y Lck. Como control, se emplearon células Jurkat normales, que por lo tanto, no expresaban la proteína myc-MAL.

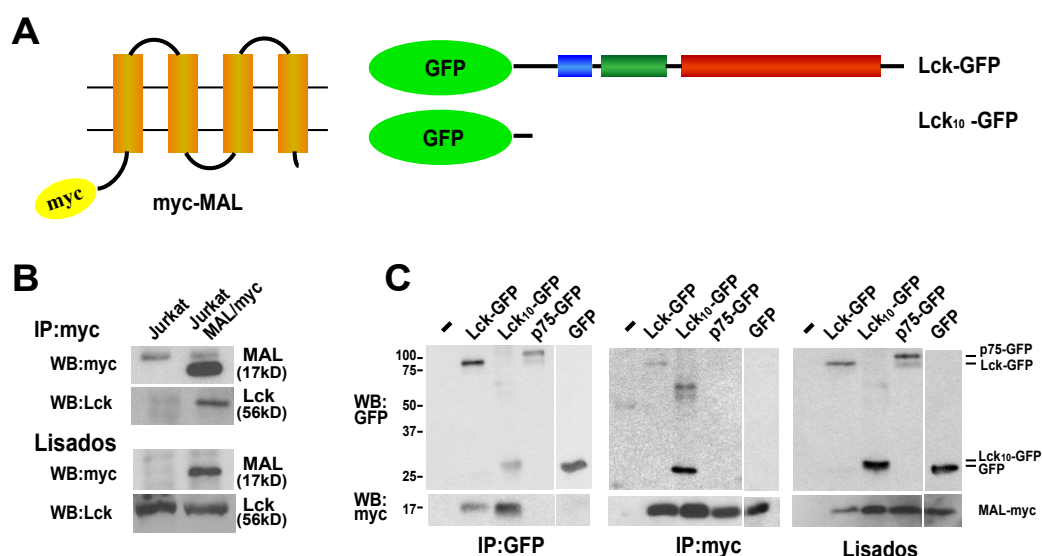


Figura 18. Asociación entre MAL y Lck. (A) Esquema de las principales construcciones empleadas en el experimento. La construcción myc-MAL posee un epítipo myc en el extremo amino terminal de MAL. La construcción Lck-GFP presenta la GFP fusionada al extremo amino terminal de la quinasa Lck. La construcción Lck10-GFP consiste en los diez primeros aminoácidos de Lck fusionados en su extremo amino con la GFP. Esta construcción conserva los tres residuos de Lck que sufren acilación, la glicina en posición 2 y las cisteínas en posiciones 3 y 5. (B) La proteína MAL fue inmunoprecipitada a partir de una lisado de células Jurkat que expresaban establemente la proteína myc-MAL. La posterior detección de Lck en los complejos inmunoprecipitados reveló la existencia de asociación de Lck y MAL. (C) La asociación entre ambas proteínas fue comprobada en células COS-7 que expresaban transitoriamente las proteínas myc-MAL y Lck-GFP, Lck10-GFP, p75-GFP o GFP inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-myc o anti-GFP y analizando los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-GFP o anti-myc respectivamente. No se encontró asociación de MAL con GFP ni con la proteína p75-GFP.

La asociación entre MAL y Lck fue también comprobada en células COS-7 que expresaban transitoriamente ambas proteínas fusionadas al epítipo myc y a la proteína GFP, respectivamente, confirmando la existencia de la interacción (Figura 18C). Ésta se observó también entre MAL y la parte de Lck correspondiente a los 10 primeros aminoácidos de la quinasa (Lck₁₀-GFP); que son los responsables de la unión de la lck a la membrana y de su incorporación en DRMs, puesto que esa secuencia presenta tres aminoácidos modificados por acilación: una glicina que se miristoila (G2) y dos cisteínas que se palmitoilan (C3 y C5). Como controles negativos, con los que no se encontró asociación alguna de MAL, se analizaron la proteína GFP y la quimera p75-GFP.

5. La expresión forzada de Lck en la membrana en las células JTIM rescata algunos de los defectos en la formación de la SI

Para averiguar si el defecto en la formación de sinapsis en las células JTIM era atribuible a la expresión deficiente de Lck en la periferia celular, se forzó la expresión de Lck en la membrana celular mediante las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck. Estas dos quimeras contienen los dominios extracelular y transmembrana de las proteínas CD4 de ratón y LAT humano, respectivamente, fusionadas al extremo N-terminal de la proteína Lck murina (Figura 19A). Para la detección de la expresión de la quimera CD4/Lck, se empleó un anticuerpo que reconoce específicamente la porción extracelular del CD4 murino, distinguiendo así la quimera del CD4 humano endógeno presente en las células. En el caso de la quimera LAT/Lck, se añadió un epítipo myc en el extremo amino terminal de la molécula, que corresponde a su región extracelular, pudiendo así ser detectada con anticuerpos anti-myc.

Se procedió a expresar las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck en las células JTIM, que después fueron conjugadas en presencia de SEE. La expresión forzada de Lck en la membrana plasmática consiguió rescatar en ambos casos la polarización del TCR, ZAP-70 y PKC- θ hacia la SI, pero no la reorientación del MTOC (Figura 19B-D). La cuantificación de este experimento se muestra en el histograma de la Figura 19E.

Investigamos también si la expresión forzada de Lck en la superficie celular era capaz de revertir los defectos en activación observados en las células JTIM. Para ello, examinamos la fosforilación de la MAP quinasa ERK1/2 y la expresión en superficie del marcador de activación CD69. Estos análisis los realizamos por citometría de flujo empleando anticuerpos específicos contra dichas proteínas. Cada una de las quimeras fue cotransfectada con un plásmido que expresaba GFP (comprobándose previamente que el índice de cotransfección era superior al 85%), para centrar el análisis en la población de células transfectadas. Las células fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y se analizó la expresión de fosfo-ERK y CD69, tras 15 minutos o 16 h respectivamente, en la población de células GFP⁺. Como se muestra en la Figura 20, las células JTIM que expresaban CD4/Lck o LAT/Lck en su superficie no respondían al estímulo activando ERK 1/2 o induciendo la expresión de CD69.

Esto indica que, aunque la ausencia de Lck en la membrana plasmática es posiblemente una de las causas principales de los defectos observados en las células deficientes en MAL, no es la única causa de los mismos.

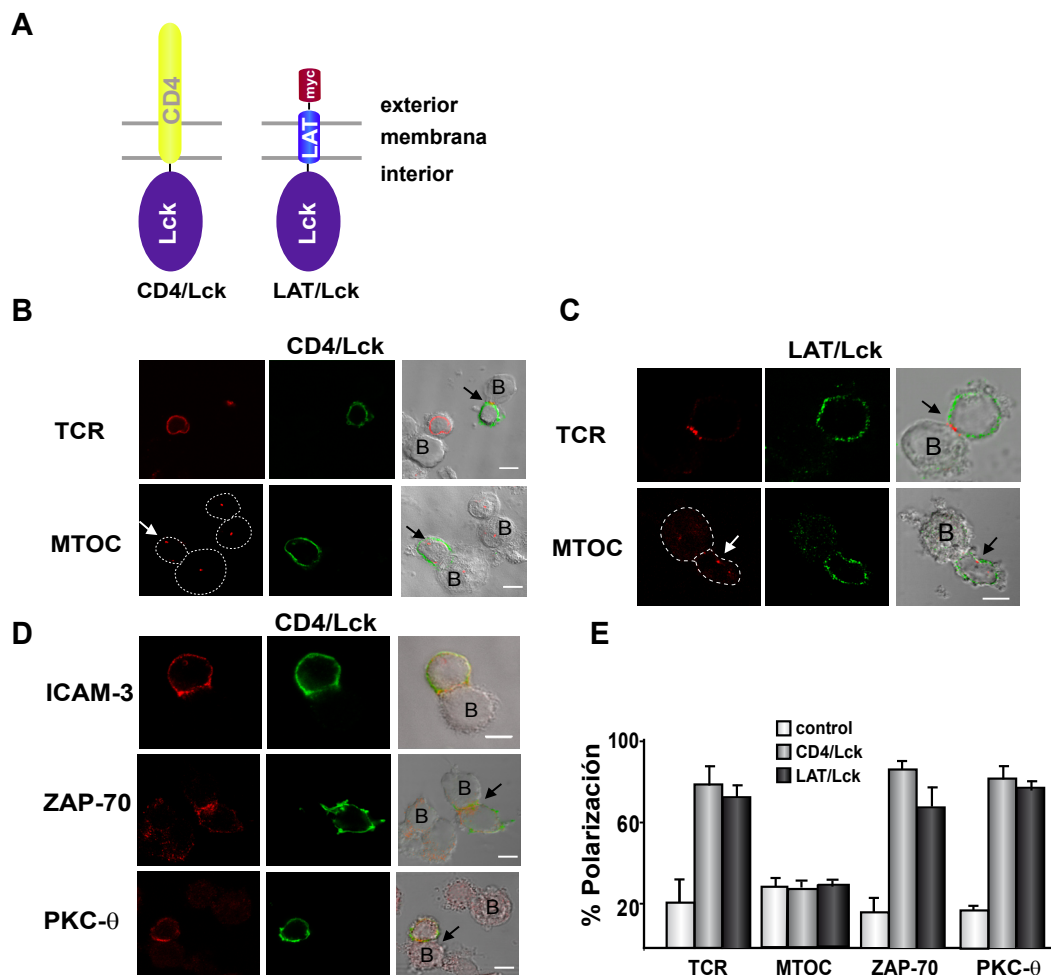


Figura 19. La expresión forzada de la Lck en la membrana plasmática en las células JTIM corrige algunos de los defectos observados en la formación de la SI. (A) Representación esquemática de las quimeras utilizadas para forzar la expresión de Lck en la membrana en células JTIM. La quimera CD4/Lck está formada por la porción transmembrana y extracelular de la proteína CD4 de ratón fusionada a la proteína Lck de ratón. La quimera LAT/Lck está formada por la porción transmembrana y extracelular de la proteína LAT humana fusionada a la proteína Lck de ratón. Además, esta quimera porta un epítipo myc extracelular para facilitar su detección mediante anticuerpos. Las células JTIM fueron transfectadas con las quimeras CD4/Lck o LAT/Lck. Tras 24 h, estas células fueron conjugadas con células Raji en presencia de SEE. 15 min después, los conjugados fueron fijados y permeabilizados. Para la detección de las proteínas quiméricas se empleó un anticuerpo anti-CD4 murino, para detectar la proteína CD4/Lck, o un anticuerpo anti-myc, para detectar la proteína LAT/Lck. Para visualizar el MTOC, se empleó un anticuerpo anti-g-tubulina. Las flechas señalan la posición del MTOC y la concentración del TCR/CD3 en la célula T que expresa la quimera (B y C). (D) Las proteínas ICAM-3, ZAP-70 y PKC-θ se detectaron mediante anticuerpos específicos. (E) El histograma muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, cuantificando 30 células en cada experimento. Barra, 5 µm.

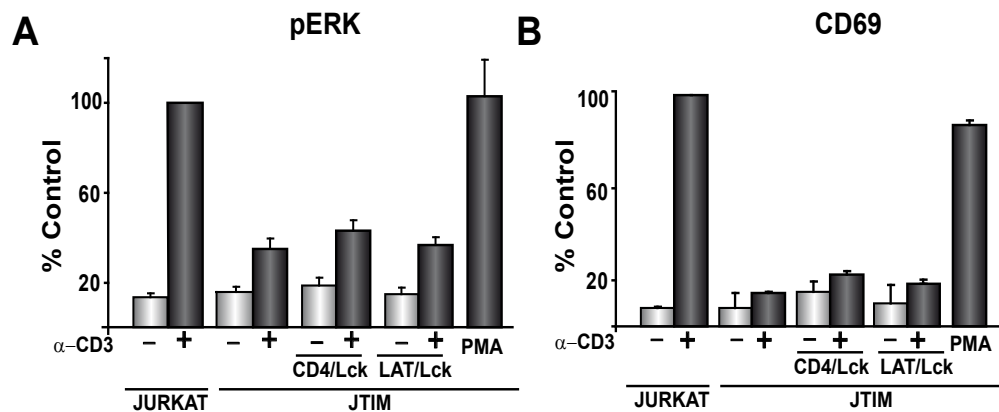


Figura 20. La expresión forzada de la Lck en la membrana plasmática en las células JTIM no corrige los defectos en la señalización celular. (A) Las células JTIM fueron cotransfectadas con GFP y las construcciones que expresaban las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck. Tras 24 h, las células fueron estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 OKT3 a 5 mg/ml durante 15 minutos. El análisis de la fosforilación de ERK se hizo mediante citometría, utilizando un anticuerpo fosfoespecífico. Las células positivas para la expresión de GFP fueron consideradas también positivas para la expresión de la quimera cotransfectada correspondiente (la eficiencia de cotransfección fue > 85%). (B) Las células fueron activadas con 5 mg/ml de OKT3 durante 16 h. Pasado este tiempo, se midió la expresión de CD69 en la superficie celular mediante citometría usando anticuerpos específicos. Ambos histogramas son el resultado de tres experimentos independientes (2000 células/experimento) y representan la media y la desviación estándar.

6. La proteína MAL y la quinasa Lck viajan en las mismas vesículas hacia la membrana plasmática.

La existencia de una asociación entre MAL y Lck nos llevó a comparar la distribución de ambas moléculas en células Jurkat. Para ello, y debido a que el anticuerpo anti-MAL no es apto para ensayos de inmunofluorescencia, empleamos un clon de células Jurkat que expresa establemente la quimera GFP-MAL. Mediante microscopía confocal, se observó que MAL se distribuye en la periferia celular y en un compartimento interno y que colocaliza en gran medida con Lck en ambas localizaciones (Figura 21A).

Basándonos en su alto grado de colocalización y en los resultados que mostraban que Lck quedaba retenida intracelularmente en ausencia de MAL, nos preguntamos si MAL desempeñaría algún papel en el transporte de Lck a la membrana plasmática. Para visualizar el movimiento de la quinasa Lck, nos servimos de la expresión transitoria de la quimera Lck-GFP. Como control, observamos que la quimera expresada reproducía el patrón de distribución estacionaria observado para la Lck endógena: de superficie e intracelular en las células Jurka y JTIM/MAL o mayoritariamente intracelular en las células JTIM (Figura 21B).

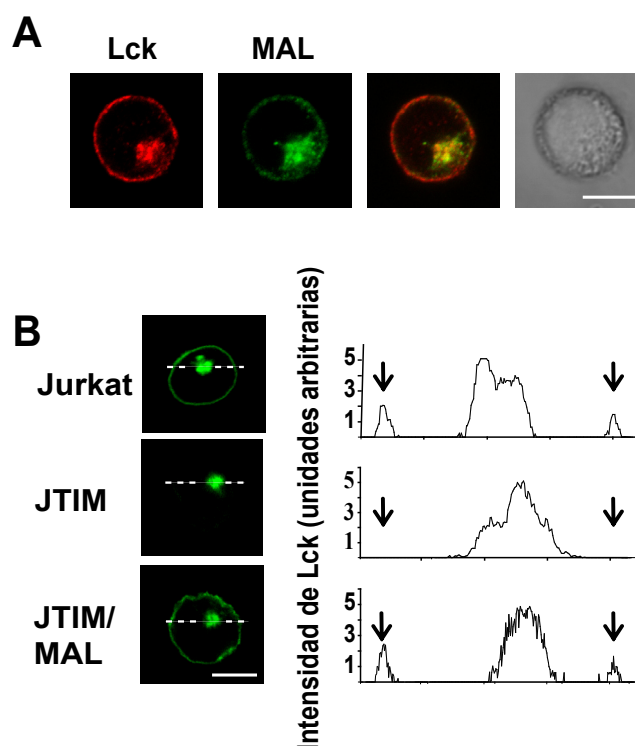


Figura 21. MAL y Lck presentan la misma distribución subcelular. (A) Las células Jurkat que expresan establemente la proteína GFP-MAL se sometieron a ensayo de inmunofluorescencia para detectar la Lck endógena. En la imagen se aprecia que ambas moléculas colocalizan tanto en membrana plasmática como en el compartimento intracelular. (B) La proteína Lck-GFP fue expresada en los tres tipos de células Jurkat. Tras 24 h, se analizó la distribución de la quimera en un microscopio de confocal. La intensidad de la fluorescencia fue analizada a lo largo de la línea de puntos trazada. Las flechas señalan la fluorescencia de la proteína expresada en la membrana. Nótese que estos picos de Lck fluorescente no aparecen en la gráfica de las células JTIM. Barra, 5 μ m.

Para visualizar de forma simultánea la dinámica de MAL y de Lck, expresamos transitoriamente la proteína Lck-Cherry en un clon de células Jurkat J77 que expresaba establemente la proteína GFP-MAL. Los experimentos de videomicroscopía, revelaron que MAL y Lck viajan en las mismas vesículas hacia la membrana plasmática (Figura 22A y Vídeo 1 del CD adjunto). El diagrama de la figura 22B muestra el alto grado de colocación observado entre ambas moléculas durante todo el experimento (el coeficiente de correlación de Pearson y el de correlación de Manders (Bolte and Cordelieres, 2006) fueron de 0,945 y 0,954 respectivamente).

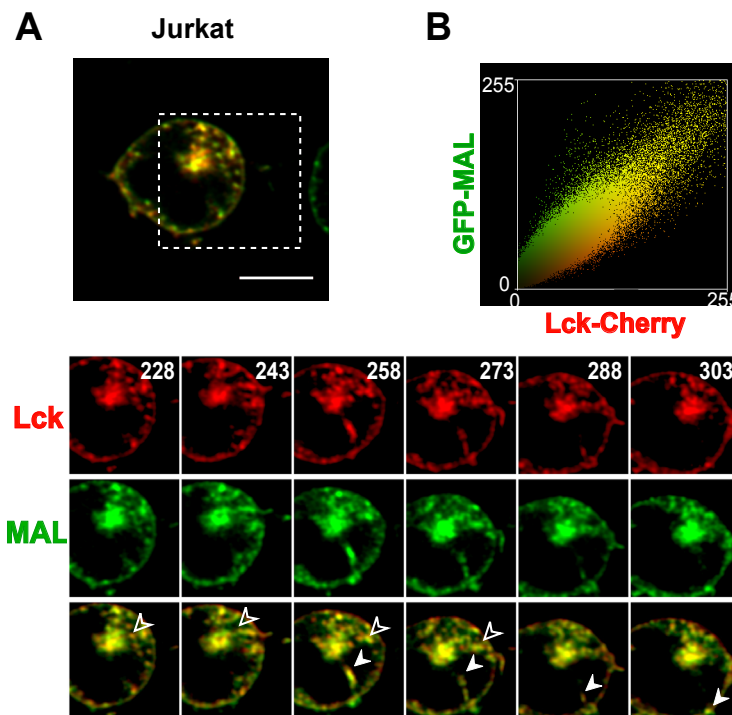


Figura 22. MAL y Lck viajan en las mismas vesículas hacia la membrana plasmática. (A) Las células Jurkat que expresan establemente la proteína GFP-MAL fueron transfectadas transitoriamente con la proteína Lck-Cherry. Tras 24h, fueron adheridas sobre cubreobjetos pretratados con fibronectina y sujetas a ensayos de videomicroscopía. Se presenta una secuencia de imágenes, de la zona recuadrada, en las que se observa a MAL y Lck viajando juntas en vesículas que emergen desde el compartimento intracelular y se dirigen hacia la membrana plasmática. Se muestra también un diagrama de la colocalización existente entre ambas proteínas durante todo el experimento. (B) Los coeficientes de correlación de Pearson y de Manders fueron de 0,945 y 0,954 respectivamente. Las cabezas de flecha señalan vesículas que viajan hacia la membrana plasmática y transportan ambas proteínas. Barra, 5 μ m. Los números indican el tiempo en segundos.

7. La expresión de MAL es necesaria para la formación de las vesículas que transportan Lck a la membrana plasmática.

Para examinar si MAL es necesaria para la formación de las vesículas que transportan Lck, expresamos la construcción Lck-GFP en los tres tipos de células Jurkat (células Jurkat normales, células JTIM y células JTIM/MAL) y realizamos ensayos de videmicroscopía. Este experimento nos mostró que, comparando con las células Jurkat control, la formación de vesículas que transportan Lck a la membrana plasmática está bloqueada en las células carentes de MAL. Sólo se observaron algunas vesículas con Lck mucho más pequeñas y de manera muy esporádica en las células JTIM (Figura 23A y B y Videos 2 y 3 del CD). La formación de estas vesículas portadoras de Lck fue restaurada en las células JTIM reconstituidas por la expresión exógena de MAL (Figura 23C y Video 4 del CD).

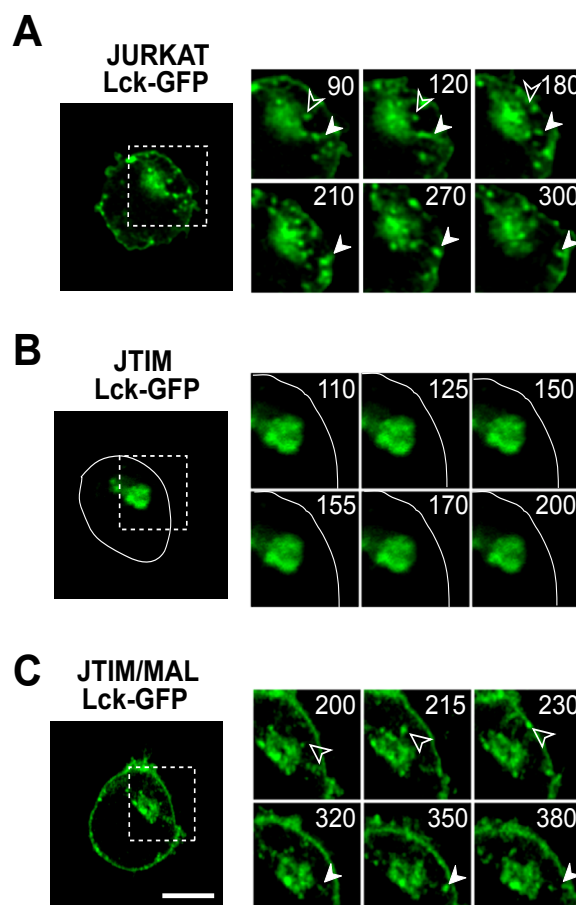


Figura 23. La proteína MAL es requerida para la formación de las vesículas transportadoras de Lck. Las células indicadas que expresaban transitoriamente la proteína Lck fusionada a GFP durante 24 h, fueron sometidas a ensayos de videomicroscopía. Las células que expresan MAL (Jurkat y JTIM/MAL) producen vesículas que transportan Lck hacia la membrana plasmática. En las células JTIM, apenas se observaron estas vesículas. Las cabezas de flecha señalan vesículas que viajan hacia la membrana plasmática. Los números indican el tiempo en segundos. Barra, 5 μm .

Como controles de que las células JTIM eran capaces de formar otro tipo de vesículas, empleamos la proteína transmembrana p75 y la tirosina quinasa Fyn. Los ensayos de videomicroscopía con estas proteínas fusionadas a GFP revelaron que en todos los casos, las células formaban vesículas transportadoras capaces de alcanzar la membrana plasmática (Figura 24A y B y Videos 5 y 6). Congruente con estas observaciones, se observó que la colocalización entre MAL y ambas proteínas era más débil que en el caso de la Lck (Figura 24C), siendo los coeficientes de Pearson y de Manders de 0,710 y 0,740 entre MAL y p75 y de 0,752 y 0,546 entre MAL y Fyn, respectivamente.

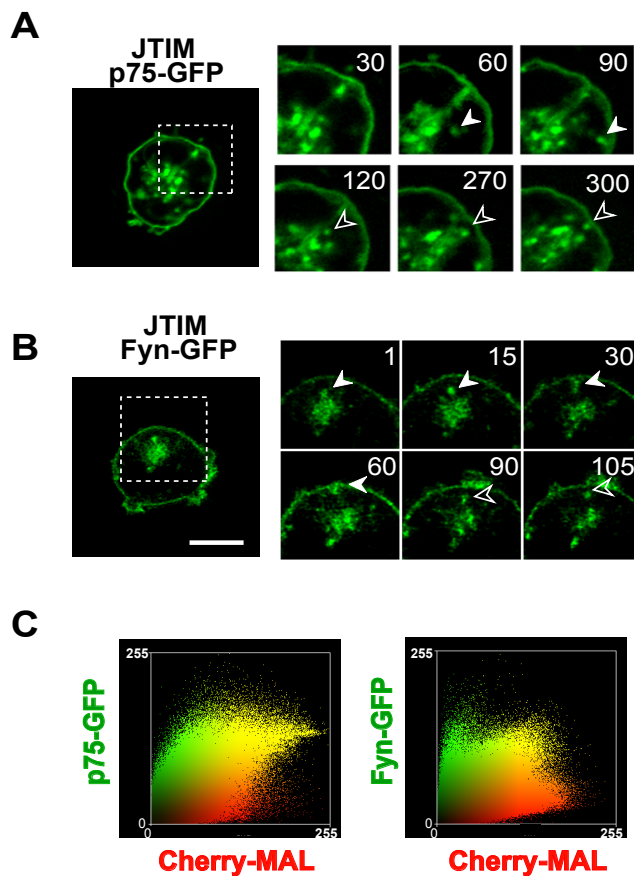


Figura 24. La ausencia de MAL no afecta al tráfico hacia la membrana plasmática de otras moléculas. (A) Experimento de videomicroscopía en células JTIM que expresaban transitoriamente la proteína p75-GFP. Las flechas indican las vesículas que emergen del compartimento interno con destino hacia al membrana plasmática. (B) el mismo experimento se llevó a cabo expresando transitoriamente la proteína Fyn, otro miembro de la familia de las Src quinasas. (C) Diagrama de colocalización correspondiente a experimentos de videomicroscopía donde las proteínas p75-GFP y Fyn-GFP se expresaron transitoriamente en un clon de células Jurkat que expresaba establemente la proteína Cherry-MAL. La colocalización entre MAL y cada una de las proteínas descritas es baja, como se aprecia en el gráfico, siendo el coeficiente de correlación de Pearson de 0,710 entre MAL y p75 y 0,740 entre MAL y Fyn. Las cabezas de flecha señalan vesículas que viajan hacia la membrana plasmática. Barra, 5 μ m. Tiempo en segundos.

8. La proteína MAL es necesaria para el reclutamiento de LAT a la SI pero no es necesaria para su transporte a membrana

El hecho de que la expresión forzada de Lck en la membrana plasmática en células carentes de MAL no restaurara los procesos posteriores a la polarización del TCR en la SI, nos indicaba que, además de su papel en el transporte de Lck, la proteína MAL debía desempeñar otras funciones durante la formación de la SI.

La proteína LAT ocupa un lugar central en el ensamblaje de la maquinaria de señalización. Para investigar si las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck restauraban el reclutamiento de LAT a la SI, analizamos la distribución de LAT endógena y exógena en las células JTIM. En ninguno de los casos observamos polarización de LAT a la SI (Figura 25A y C). Este resultado fue comprobado para LAT endógeno en células Jurkat silenciadas para la expresión de MAL mediante el plásmido pSupershMAL/GFP (Figura 25B) y para LAT exógeno en células transfectadas con el plásmido pSupershMAL/LAT-GFP (Figura 25D y E).

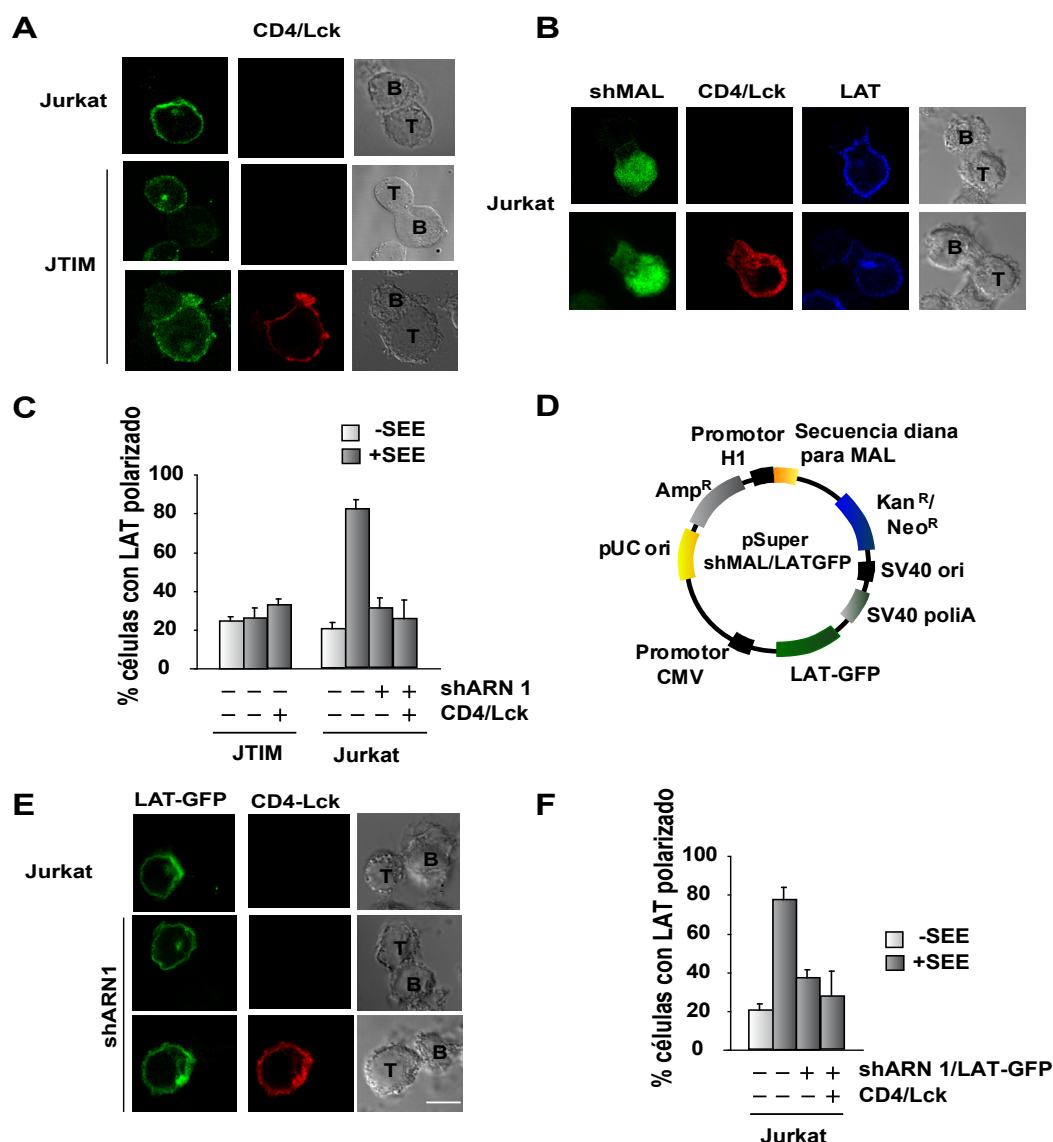


Figura 25. La proteína MAL es necesaria para la concentración de LAT en la SI. (A) La proteína CD4/Lck fue expresada en las células Jurkat y JTIM, y 24 h después, estas células se conjugaron con células Raji en presencia de SEE. Los conjugados fueron fijados y permeabilizados 15 minutos después de la conjugación para analizar la distribución de LAT. La quimera CD4/Lck se detectó por un anticuerpo anti-CD4 murino. (B) Se transfectaron células Jurkat con el plásmido pSupersshMAL/GFP. Tras 48 h, se conjugaron con células Raji en presencia de SEE. Se analizó la distribución en la SI de la proteína LAT endógena mediante un anticuerpo específico. Las células que expresaban el shARN para MAL se identificaron por la expresión de GFP. (C) El histograma muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar. (D) Representación esquemática del plásmido pSuper shMAL/LAT-GFP. (E) Las células Jurkat se transfectaron con los plásmidos que codifican para LAT-GFP, con el plásmido pSuper shMAL/LAT-GFP o con éste último y la quimera CD4/Lck de forma simultánea. Tras 48 h, las células se conjugaron con células presentadoras en presencia de SEE y se fijaron para analizar por microscopía confocal la distribución de la proteína LAT-GFP. Para la detección de la expresión de la proteína quimérica CD4/Lck se utilizó un anticuerpo anti-CD4 murino. Barra, 5 μ m. (F) El histograma muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Las barras muestran la desviación estándar.

El hecho de que LAT no se polarizara a la SI, nos llevó a comprobar si, de manera análoga a lo que ocurría con Lck, el transporte de LAT hacia la membrana se veía afectado en ausencia de MAL en células en reposo. De nuevo se utilizó el plásmido pSupershMAL/LAT-GFP (Figura 25D). Como se puede observar en la Figura 26 (paneles A y B), no se apreciaron diferencias significativas en la producción de vesículas de LAT-GFP entre las células suprimidas y las control. Como control del experimento, se utilizó el plásmido pSupershMAL/Lck-GFP. En este caso, igual que ocurría en el caso de las células JTIM, la proteína de fusión Lck-GFP quedaba retenida intracelularmente, produciéndose esporádicamente pequeñas vesículas que viajaban hacia la membrana plasmática (Figura 26C).

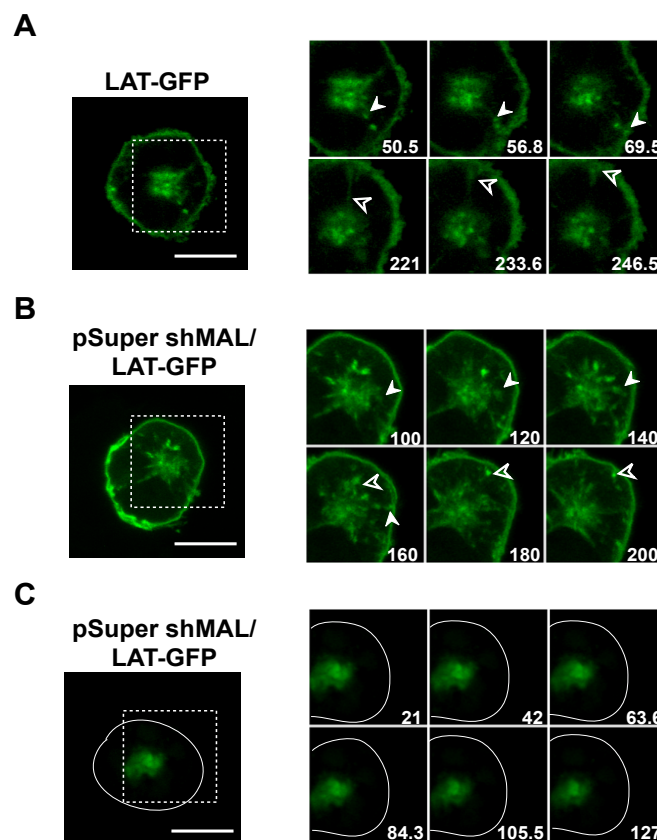


Figura 26. La proteína MAL no es necesaria para el transporte de LAT a la membrana plasmática.

Las células Jurkat fueron transfectadas con plásmidos que codifican para la proteína LAT-GFP (A), shARN1 de MAL y LAT-GFP (B) y shARN1 de MAL y Lck-GFP (C). Tras 48 h, las células fueron adheridas sobre vidrio recubierto de fibronectina y sometidas a ensayos de videomicroscopía con un microscopio confocal. Las flechas señalan vesículas que emergen del compartimento interno y se fusionan con la membrana plasmática. Los números indican el tiempo en segundos. Barra, 5 μm .

Estos experimentos sirvieron para demostrar que el tráfico de LAT no es dependiente de MAL en linfocitos T en estado estacionario

9. La proteína MAL se concentra en la SI

La evidencia de que la proteína MAL debía ejercer algún tipo de función durante la formación de la SI, nos llevó a investigar su dinámica en el linfocito T cuando se produce el reconocimiento antigénico.

En el linfocito T en estado de reposo, la proteína MAL se distribuye en diferentes localizaciones (Figura 27A): la membrana plasmática, un acúmulo intracelular correspondiente a endosomas pericentriolares y en vesículas que decoran los microtúbulos (estas últimas se observan mejor en experimentos *in vivo* ya que se suele perder su tinción tras la fijación de las células).

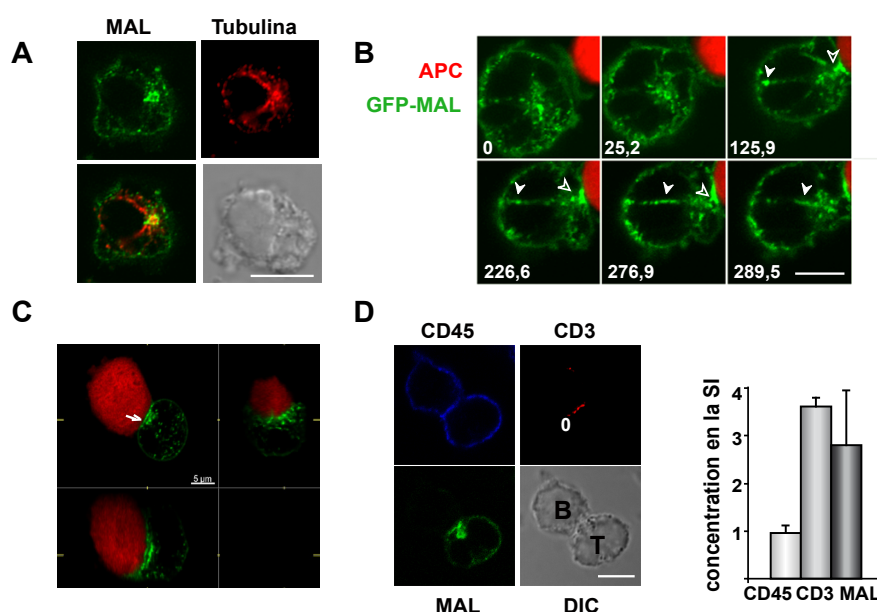


Figura 27. La proteína MAL se concentra en la SI. (A) Células J77 que expresaban establemente la proteína GFP-MAL fueron adheridas sobre cristales tratados con poli-L-lisina, fijadas y permeabilizadas. La detección de los microtúbulos se llevó a cabo mediante un anticuerpo anti- α -tubulina. (B) Experimento de videomicroscopía que muestra células J77 que expresaban establemente la proteína GFP-MAL adheridas sobre vidrio recubierto de fibronectina. Sobre las células, se añadieron células Raji cargadas con SEE y previamente marcadas con la sonda CMTMR. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal. Las flechas señalan el movimiento de vesículas hacia y desde el compartimento interno de MAL. Los números muestran el tiempo en segundos. (C) Vistas de una reconstrucción tridimensional de un conjugado 30 min después de la formación de la SI. En rojo, la célula presentadora; en verde, la proteína GFP-MAL. La flecha señala el acúmulo de MAL en el contacto entre las dos células. (D) La imagen muestra un conjugado de una célula J77 que expresan establemente la proteína GFP-MAL. Estas células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos para analizar la distribución de CD3 y CD45. El histograma muestra el enriquecimiento en la SI de MAL, CD3 y CD45 con respecto a la cantidad de cada proteína presente en la parte opuesta de la membrana plasmática. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia de 20 conjugados. Las barras representan la desviación típica del experimento. Barras, 5 μ m.

Para analizar la respuesta de MAL a la estimulación con un antígeno presentado por una APC, se utilizaron las células Jurkat J77 que expresaban establemente la proteína GFP-

MAL. Los experimentos de videomicroscopía con este clon muestran que MAL se concentra en la zona de la SI inmediatamente después de que se haya producido el contacto. Esta concentración es consecuencia del material aportado por las vesículas que emergen desde el compartimento endosomal y viajan direccionalmente a la zona de la sinapsis, fusionándose con la membrana plasmática en ese lugar (Figura 27B y Video 7). La figura 27C muestra las vistas de una reconstrucción tridimensional de un conjugado 30 minutos después de producida la sinapsis. En ella se observa cómo la proteína GFP-MAL sigue concentrada en la zona del contacto, y el compartimento endosomal (representado por el gran acúmulo intracelular de MAL), permanece reorientado y colocado en un lugar adyacente a la zona del contacto.

Se cuantificó los niveles de MAL en el contacto, resultando ésta tres veces enriquecida en la SI respecto a la proteína MAL existente en otras zonas de la membrana (Figura 27D). Los controles empleados fueron la molécula CD3 (concentrada $\approx 3,7$ veces) y la tirosina fosfatasa CD45, que se distribuye homogéneamente por toda la superficie de la célula T.

Curiosamente, la proteína MAL también se concentra en la zona de contacto célula T-APC en ausencia de SEE (Figura 28A y Vídeo 8 del CD), aunque, en este caso, el contacto no es tan estable, puesto que no existe antígeno presentado. Esta observación sugiere que

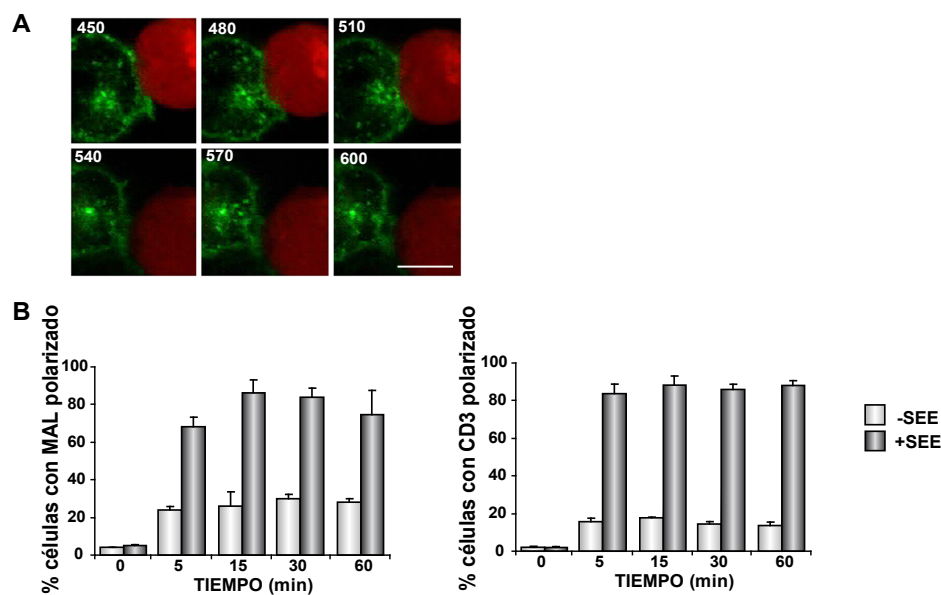


Figura 28. La proteína MAL se concentra en la zona de contacto con la APC también en ausencia de antígeno. (A) Las células J77 que expresan establemente la proteína GFP-MAL, fueron sometidas a ensayos de videomicroscopía con un microscopio confocal. Las células presentadoras se marcaron con una sonda roja (CMTMR). El experimento se realizó en ausencia de SEE. Los números muestran el tiempo en segundos. (B) Cinética de conjugación. En ella se muestra el porcentaje de células con MAL y CD3 polarizados y concentrados en la membrana que contacta con la APC a distintos tiempos, en presencia y ausencia de SEE. Barra, 5 μm .

MAL podría desempeñar alguna función durante las primeras etapas de la interacción entre el linfocito T y la APC.

La Figura 28B representa una cinética de conjugación donde se mide el número de conjugados con la proteína MAL polarizada. Este número aumenta de forma progresiva paralelamente al número de conjugados con CD3 polarizado.

10. Caracterización de los clones de células Jurkat establemente transfectados con las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG

La SI constituye una región de membrana altamente ordenada, en la que se distinguen varias zonas definidas por un patrón concéntrico de proteínas: el cSMAC, donde se concentra el TCR, y el pSMAC, enriquecida en integrinas, como LFA-1, y proteínas de citoesqueleto.

En un intento por definir con más detalle la región de la sinapsis donde se concentra la proteína MAL, analizamos de forma comparativa la distribución de MAL y de marcadores del cSMAC y del pSMAC. Dado que el mAb anti-MAL 6D9 no funciona para técnicas de inmunofluorescencia, utilizamos clones de células Jurkat que expresaban establemente la proteína myc-MAL. Para facilitar la detección de la proteína MAL presente en la membrana,

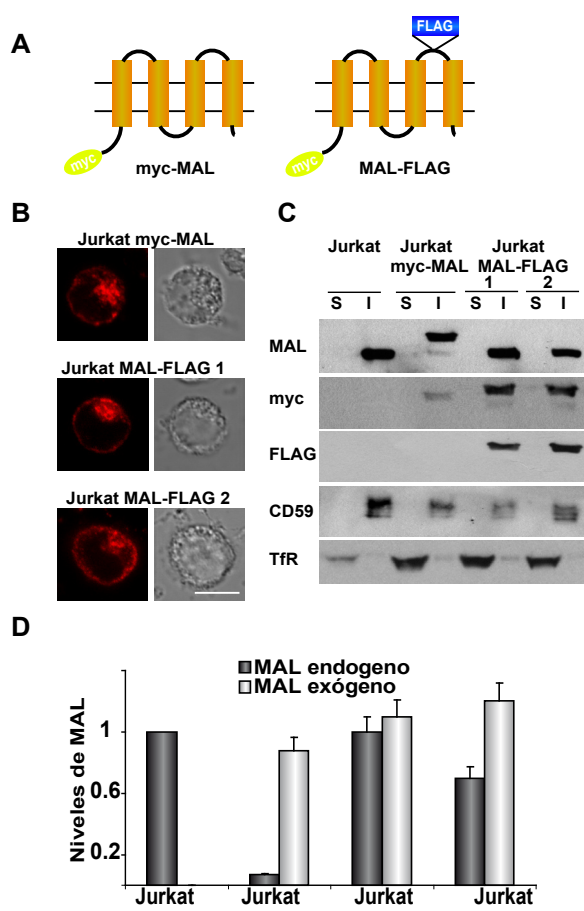


Figura 29. Caracterización de los clones estables de células Jurkat que expresan las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG.

(A) Esquema de las construcciones de MAL utilizadas. La construcción myc-MAL tiene un epítipo myc fusionado al extremo amino terminal de MAL. La construcción MAL-FLAG, además del epítipo myc, tiene interrumpido el último bucle extracelular de MAL mediante la adición de secuencias adicionales con el epítipo FLAG. (B) Las células Jurkat que expresan las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG de manera estable fueron adheridas sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, fijadas, permeabilizadas y sometidas a ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-myc para analizar la distribución subcelular de MAL. (C) La inclusión de las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG en balsas de membrana, fue analizada realizando experimentos de aislamiento de DRMs mediante ultracentrifugación de equilibrio en gradientes de densidad de sacarosa. La inmunodetección de las proteínas se hizo empleando anticuerpos anti-MAL, anti-myc y anti-FLAG. Como control del experimento se examinó la presencia de CD59 y la del receptor de transferrina (TfR) en las fracciones insoluble (I) y soluble (S) del gradiente. (D) Cuantificación de los niveles de proteína MAL expresados por cada clon celular.

generamos también clones estables de células Jurkat que expresaban la proteína MAL-FLAG. Esta proteína MAL tiene el último bucle extracelular modificado mediante la adición de un epítipo FLAG (Figura 29A) (Puertollano et al., 1999).

Primeramente se comprobó que la adición del epítipo FLAG no afectaba ni a la distribución subcelular de la proteína (Figura 29B) ni a su inclusión de la misma en las balsas de membrana (Figura 29C). La figura 29D muestra una cuantificación de los niveles de expresión de la proteína MAL endógena y exógena en los distintos clones. Es de resaltar que, mientras que con la construcción myc-MAL, los niveles de expresión de la proteína exógena compensaban los niveles de expresión de la proteína MAL endógena hasta igualar los niveles expresados en unas células Jurkat control, la construcción MAL-FLAG se

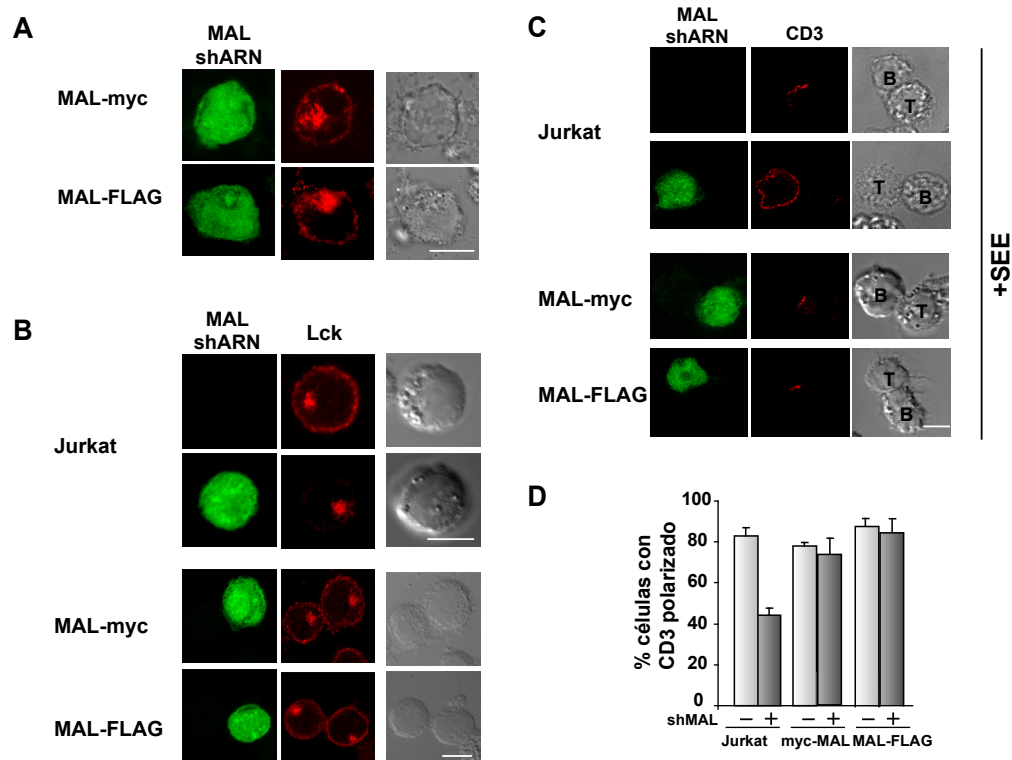


Figura 30. Las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG son capaces de reemplazar funcionalmente a la proteína MAL endógena. La proteína MAL endógena fue silenciada mediante expresión transitoria del plásmido pSupershMAL/GFP en clones que expresaban establemente las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG, cuyo ARNm ha sido diseñado para ser insensible al shARN expresado. Tras 48 h, las células fueron adheridas a cubreobjetos, fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos. (A) Inmunodetección de las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG realizada con un anticuerpo anti-myc. Se muestra que las proteínas MAL exógenas son resistentes al shARN expresado para MAL. (B) Inmunodetección de Lck en células Jurkat control y silenciadas (C) Las células silenciadas de MAL fueron conjugadas con células Raji durante 15 minutos en presencia de SEE, fijadas e incubadas con un anticuerpo anti-CD3. Barra, 5 μ m. (D) Cuantificación del experimento de conjugación. La gráfica muestra la media de tres experimentos independientes y la desviación típica.

sobreexpresaba sin afectar a la expresión de la proteína MAL endógena.

Para comprobar la funcionalidad de los clones que expresan las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG, se silenció la expresión de la proteína MAL endógena mediante expresión

transitoria del plásmido pSupershMAL/GFP. Previamente se demostró que este plásmido silenciaba eficientemente la proteína MAL endógena (Figura 15A), pero no silenciaba la expresión de la proteína exógena (Figura 30A). Comprobamos que tanto las células que expresaban la proteína myc-MAL como las que expresaban la proteína MAL-FLAG expresaban Lck en la membrana plasmática (Figura 30B) y formaban conjugados polarizando CD3 correctamente (Figura 30C).

Por otra parte, quisimos comprobar si las células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG se activaban correctamente. Para ello, se analizó la fosforilación de las proteínas CD3 ζ , ZAP-70 y PLC- γ . En estos experimentos, se activaron las células mediante contacto con APC en presencia o ausencia de SEE. A los 15 minutos, se lisaron y de los lisados se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en tirosina, que, posteriormente, fueron sometidas a ensayos de inmunodetección con los anticuerpos apropiados. El resultado de este experimento mostró que tanto las células que expresaban myc-MAL como las que expresaban MAL-FLAG la fosforilación en residuos de tirosina en respuesta a la activación no estaba alterada (Figura 31A).

Por otra parte, se realizó una cinética para medir el nivel de fosforilación de la MAP quinasa ERK 1/2 tras la activación, observándose una fosforilación adecuada (Figura 31B).

También se examinaron procesos más tardíos de activación. Para ello, medimos el nivel de expresión en la superficie celular del marcador de diferenciación CD69, cuya expresión está regulada transcripcionalmente por el factor AP-1. Para ello, se activaron las células y se midió la expresión de CD69 16 h después mediante citometría de flujo, observando una inducción correcta del mismo (Figura 31C).

Por último medimos la internación y degradación del TCR mediante de citometría de flujo, no encontrándose tampoco anomalías (Figura 31 D).

Con todos estos experimentos concluimos que la adición de los epítomos a la proteína MAL no afectó a la función de la proteína.

11. MAL se concentra en la zona central de la SI (cSMAC)

Habiendo comprobado que los clones de células Jurkat que expresan establemente las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG eran capaces de formar SI y se activaban correctamente, quisimos utilizarlos para estudiar más detalladamente la distribución de MAL en la SI.

Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron las células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG, para realizar experimentos de doble marcaje con marcadores del cSMAC y del pSMAC. Los experimentos de conjugación localizan a la proteína myc-MAL en la zona central de la sinapsis (cSMAC), colocalizando con marcadores de esta zona como el CD3 (Figura 32C) y flanqueada por marcadores del pSMAC (Figura 32A) como la actina. Sin embargo, en el caso de MAL-FLAG la distribución fue la inversa, es decir, colocalizaba

con actina (Figura 32A) y era excluido de la zona enriquecida en CD3 (Figura 32C). La cuantificación de este experimento se muestra como histograma en la figura 32F. La colocalización de MAL-FLAG en la zona de la sinapsis con otros marcadores del pSMAC

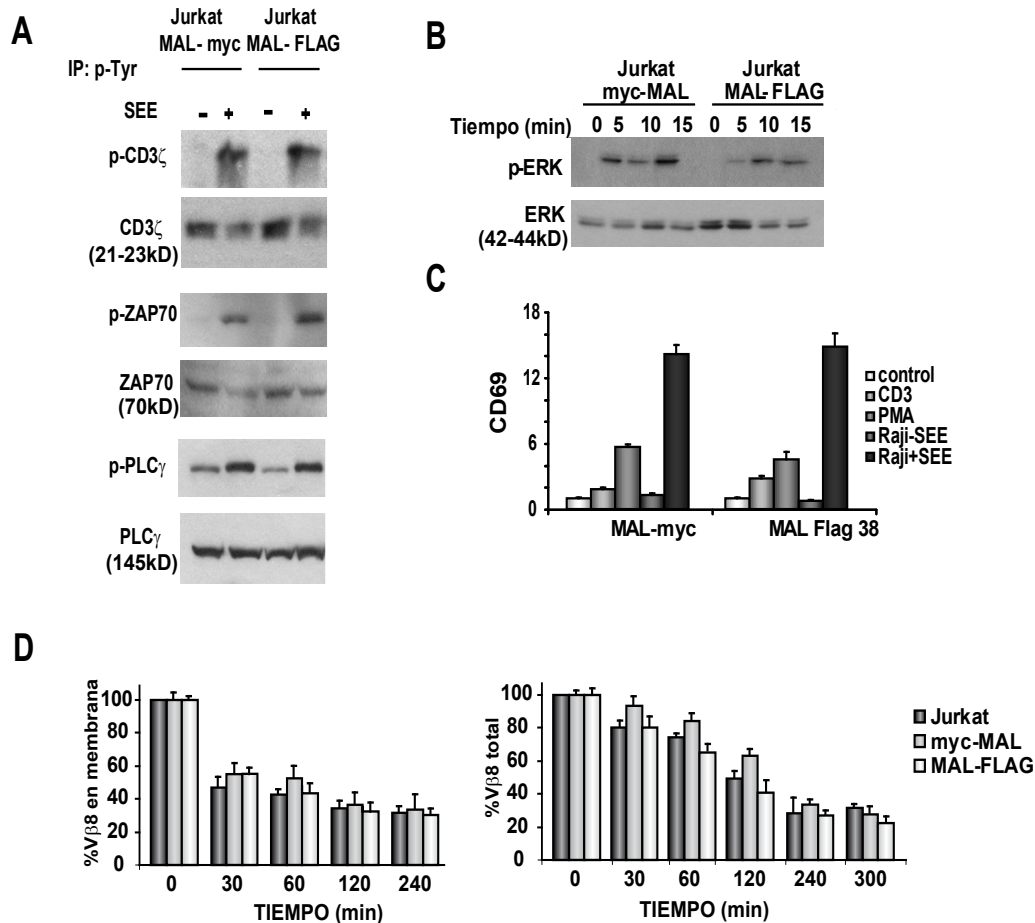


Figura 31. La expresión de las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG no afecta a los procesos relevantes de activación en el linfocito. (A) Las células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE. Tras lisar las células, se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en tirosina con un anticuerpo anti-fosfotirosina acoplado a bolas de agarosa. La lisis se realizó en tampón 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, en presencia de inhibidores de fosfatasas y proteasas. Los inmunoprecipitados y los lisados originales se sometieron a ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos para CD3 ζ , ZAP-70 y PLC γ . (B) Células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG fueron conjugadas durante distintos tiempos con células Raji en presencia de SEE. Las muestras fueron sometidas a inmunoblot con un anticuerpo anti-fosfo-ERK y anti-ERK total. (C) La inducción de CD69 en los dos tipos celulares fue analizada con un anticuerpo específico mediante citometría tras estimular las células con un anticuerpo anti-CD3 (5 mg/ml OKT3), PMA (50 ng/ml) o células Raji+SEE. El análisis se realizó 16 h después de estimular las células. (D) Se determinó la internación y degradación del TCR por citometría y con un anticuerpo anti-V β 8 en presencia de 10 mg/ml de cicloheximida. Las células se incubaron con células presentadoras y la cantidad de TCR se midió a los tiempos indicados. Para medir la internación del TCR, se detuvo la conjugación con PBS frío y las células se incubaron con el anticuerpo anti-V β 8 para detectar el TCR presente en la membrana. Para medir la degradación, las células fueron fijadas en formaldehído 2%, permeabilizadas con PBS, 3% BSA, 2% saponina e incubadas con el anticuerpo anti-V β 8

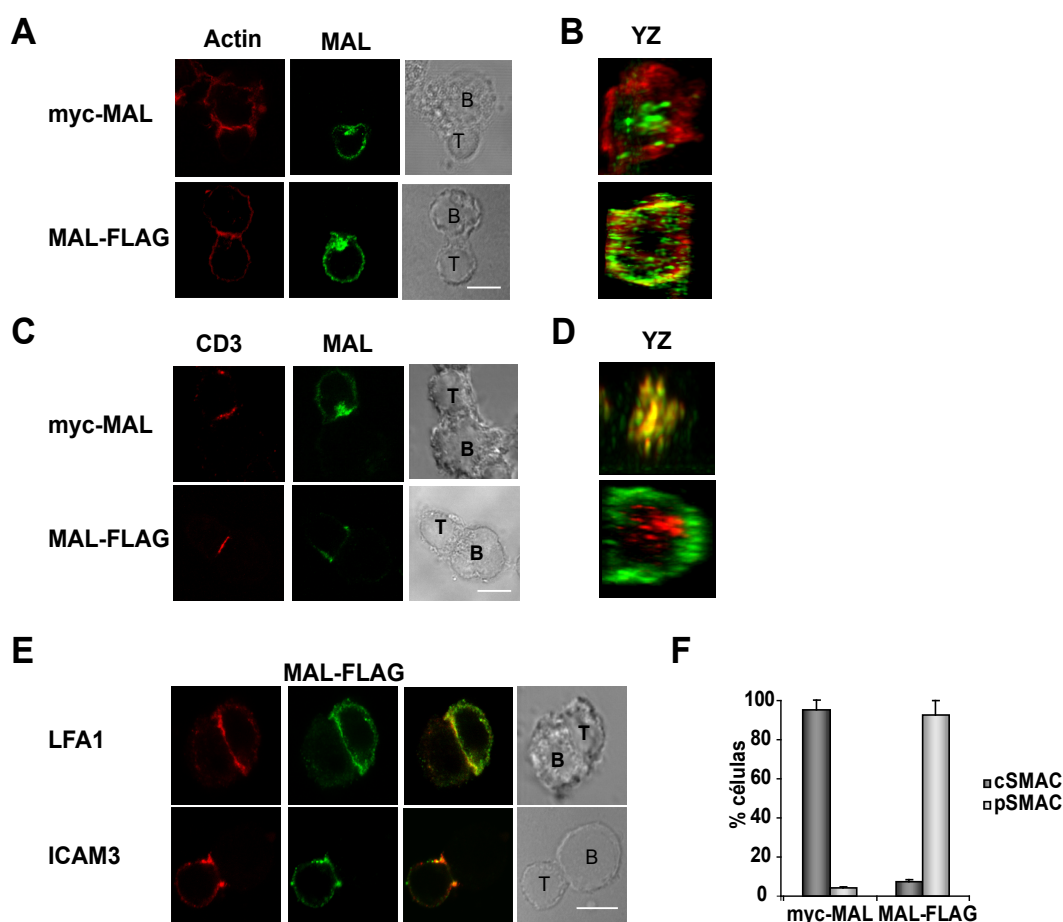


Figura 32. La modificación del último bucle hidrofílico de MAL deslocaliza la molécula al pSMAC. Las células Jurkat que expresan establemente las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG fueron conjugados durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE, fijados, permeabilizados y sometidos a doble inmunofluorescencia para detectar MAL y actina (A), CD3 (C), y LFA-1 e ICAM-3 (E) La detección de MAL se hizo mediante un anticuerpo anti-myc en las células que expresan establemente la proteína myc-MAL y un anticuerpo anti-FLAG en las que expresan la proteína MAL-FLAG. Los paneles B y D muestran la vista ortogonal de la SI.

como la integrina LFA-1 o la molécula de adhesión ICAM-3, confirmó la localización de MAL-FLAG en el pSMAC (Figura 32E).

Para examinar la dinámica de la proteína MAL con el último bucle extracelular modificado, se generaron clones estables de células Jurkat J77 que expresaban la proteína MAL modificada fusionada a GFP (Figura 33A). De forma análoga a lo que ocurría con la proteína MAL normal, MAL-FLAG se detecta en el lamelipodio que rodea la APC y en la región pericentriolar. Sin embargo, MAL-FLAG parece concentrarse en las regiones más periféricas del lamelipodio y permanece en esa zona (Figura 33B y Vídeo 9). El enriquecimiento de esta proteína en la SI fue similar al observado para la proteína myc-MAL y aparece cuantificado en la Figura 33C.

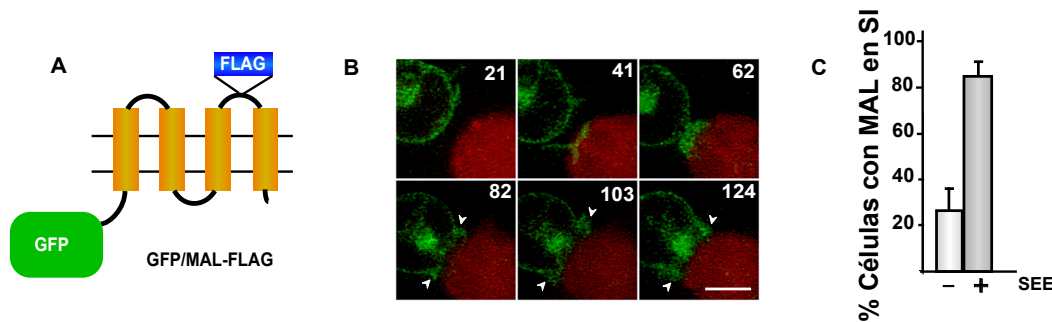


Figura 33. La mutación del último bucle extracelular de MAL deslocaliza la proteína a la zona periférica de la SI. (A) Representación esquemática de la molécula GFP/MAL-FLAG usada para experimentos de videomicroscopía. (B) Células J77 que expresaban establemente la proteína GFP/MAL-FLAG fueron adheridas sobre placas con fondo de vidrio recubiertas con fibronectina y sometidas a experimentos de videomicroscopía en presencia de células Raji cargadas con SEE. Las células presentadoras fueron marcadas con una sonda fluorescente (CMTMR, a 5 mM). Las flechas señalan al acúmulo de MAL en la periferia de la SI. (C) El histograma muestra el porcentaje de células con MAL concentrado en la SI en presencia y ausencia de antígeno. Barra, 5 μ m. Los números indican el tiempo en segundos.

Conjuntamente, estos resultados muestran que una proporción de MAL es rápidamente trasladada a la zona central de la SI tras el contacto con la APC, y este tráfico direccionado requiere de la integridad del último bucle extracelular de la molécula.

12. La modificación del último bucle extracelular de MAL afecta a la localización en la SI de otras proteínas

Como se ha mostrado, la distribución del TCR/CD3, F-actina, LFA-1 o ICAM-3 no resultó afectada por la expresión de MAL-FLAG (Figuras 32). La deslocalización de esta molécula al pSMAC, nos llevó a investigar si esta alteración producía cambios en la distribución de otras proteínas del cSMAC. Los primeros candidatos a examinar fueron la quinasas Lck y la proteína adaptadora LAT, cuya presencia en la SI requiere la expresión de MAL. Se observó que, mientras que en presencia de la proteína MAL con el bucle extracelular intacto, ambas proteínas se concentraban en la zona central de la SI, tanto Lck como LAT fueron deslocalizadas al pSMAC junto con la proteína MAL-FLAG, tal y como se muestra en la Figura 34A.

Se examinó también la distribución en la SI de otras proteínas como CD4, que se transporta asociado a Lck hacia la membrana plasmática (Bijlmakers and Marsh, 1999), o las quinasas ZAP-70 y PKC- θ , necesarias para la activación del linfocito. En ninguno de los tres casos, se observaron cambios de localización como consecuencia de la expresión de MAL-FLAG (Figura 34 C y D).

La deslocalización de Lck y LAT del cSMAC al pSMAC observada en células con MAL-FLAG se corroboró expresando transitoriamente las proteínas de fusión Lck-GFP y LAT-GFP (Figura 34 E y F).

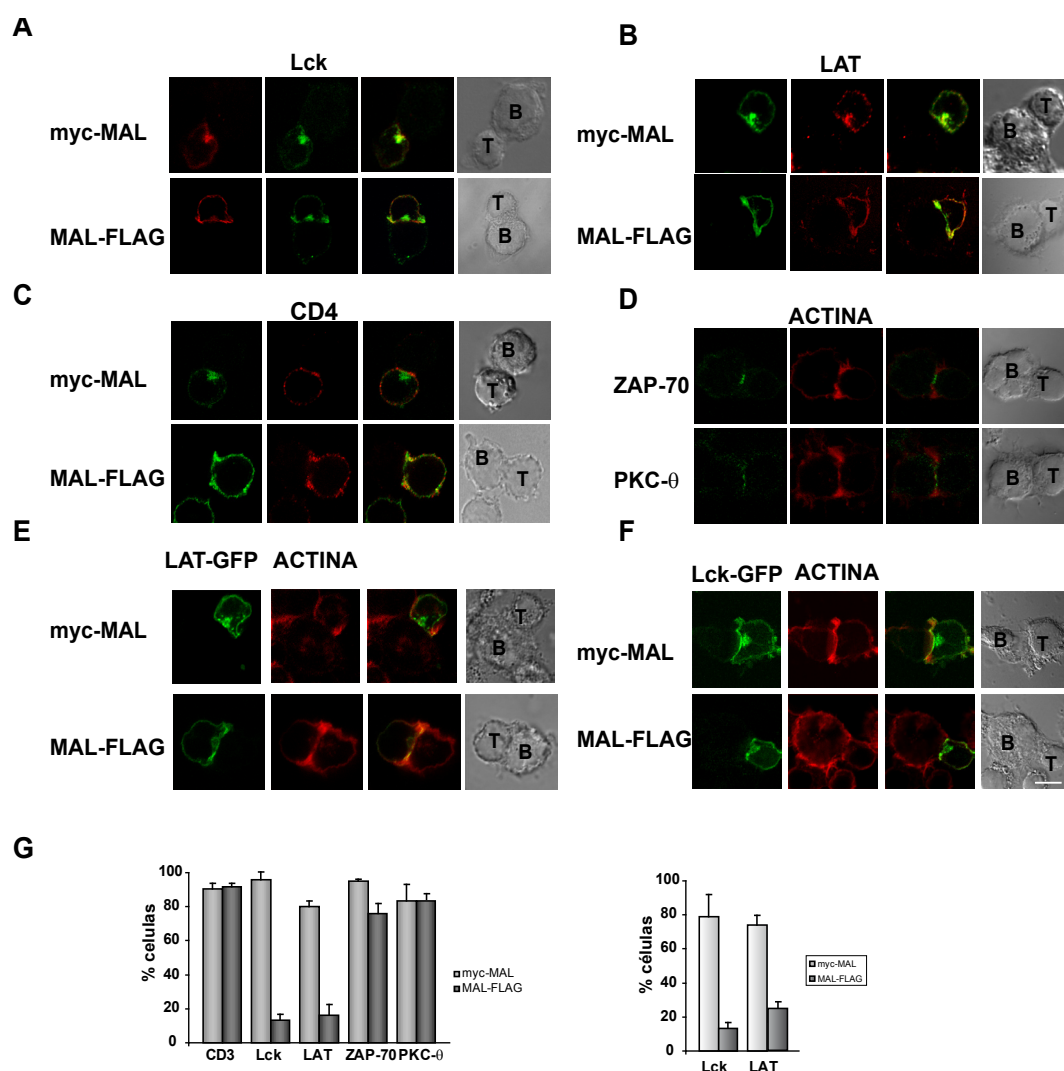


Figura 34. La localización de MAL-FLAG en el pSMAC afecta a la distribución de las proteínas Lck y LAT en la SI. Las células Jurkat que expresaban establemente las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG fueron conjugados con células Raji durante 15 minutos en presencia de SEE, fijadas, permeabilizadas y analizadas por microscopía de fluorescencia para detectar las proteínas MAL exógenas (con un anticuerpo anti-myc) y las proteínas Lck (A), LAT (B) y CD4 (C) endógenas, con anticuerpos específicos. (D) Las células Jurkat que expresa establemente la proteína MAL-FLAG fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE. Los conjugados fueron adheridos en vidrio recubierto de poli-L-lisina, fijados, permeabilizados y analizados con anticuerpos específicos para detectar ZAP-70 y PKC θ , o faloidina fluorescente para teñir la F-actina. Las células fueron transfectadas con las construcciones LAT-GFP (E) y Lck-GFP (F). Tras 24 h de expresión, fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE, fijadas y permeabilizadas Barra, 5 μ m. (G) Los histogramas muestran la cuantificación de tres experimentos independientes (30 células/experimento). Las barras representan la desviación típica.

Los mismos resultados fueron obtenidos cuando se silenció la proteína MAL endógena mediante expresión del plásmido pSupershMAL/GFP (Figura 35 A y B).

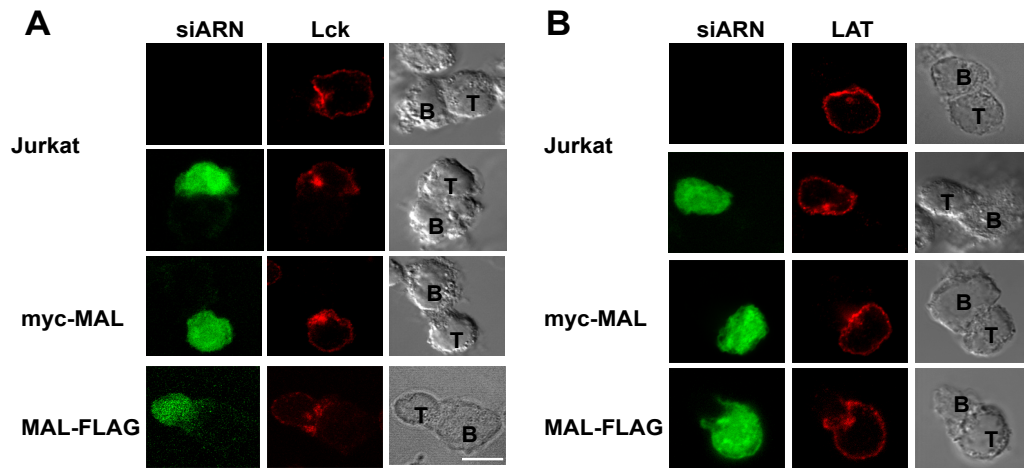


Figura 35. El efecto de la proteína MAL-FLAG sobre la distribución de Lck y LAT en el pSMAC es independiente de la expresión de la proteína MAL endógena. Las células Jurkat control y Jurkat que expresaban establemente las proteínas myc-MAL y MAL-FLAG fueron transfectadas con el plásmido pSuper shMAL/GFP. Tras 48 h de expresión, las células fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE, fijadas y permeabilizadas para la detección de Lck (A) y LAT (B) mediante anticuerpos específicos. Barra, 5 μ m.

Examinamos la dinámica de las proteínas Lck-GFP y LAT-GFP en células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG mediante experimentos de videomicroscopía. Tal y como muestra la Figura 36, la dinámica de concentración en la SI de Lck y LAT en ambos clones varía en el estadio final, cuando ambas proteínas quedan concentradas en la zona central del contacto, en el caso de las células que expresan MAL normal, o en la zona periférica, si expresan la proteína MAL modificada.

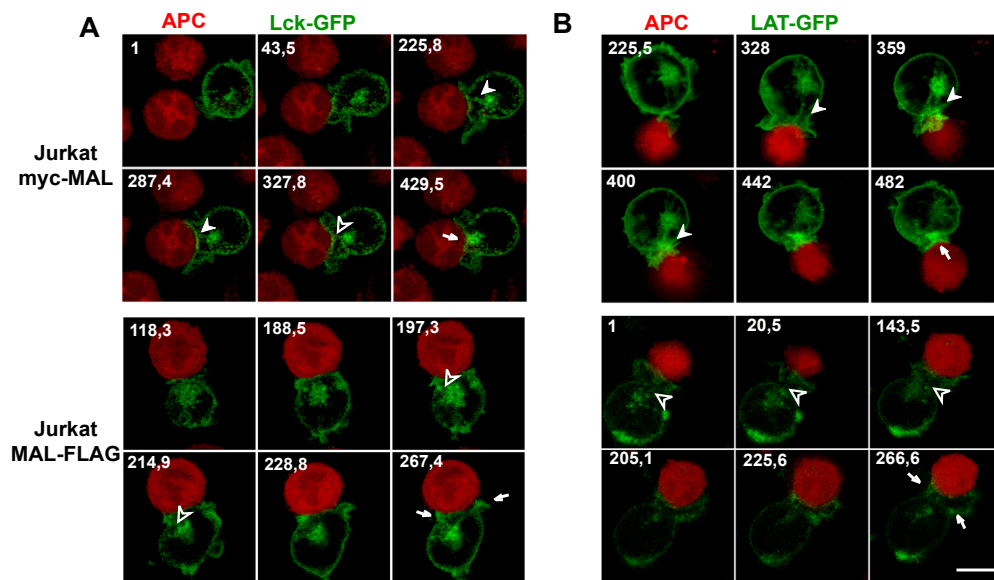


Figura 36. Dinámica de las proteínas Lck-GFP y LAT-GFP en presencia de la proteína MAL normal o modificada en el último bucle extracelular. Las células Jurkat que expresaban establemente las proteínas myc-MAL (A) y MAL-FLAG (B) fueron transfectadas con plásmidos que codificaban para las proteínas Lck-GFP y LAT-GFP. Tras 24 h, se realizaron ensayos de videomicroscopía en presencia de células Raji cargadas con SEE. Las células presentadoras se marcaron con una sonda fluorescente roja para poder distinguirlas. Las cabezas de flecha muestran vesículas que emergen desde el compartimento intracelular y viajan hacia la membrana plasmática. Las flechas indican la zona de la membrana donde se acumulan Lck o LAT. Barra, 5 μ m. Los números indican el tiempo en segundos.

13. La proteína MAL transporta Lck a la SI

Los experimentos en los que se observó que la localización de las proteínas Lck y LAT en los distintos anillos del SMAC correlacionaba con la acumulación de la proteína MAL en la misma zona, nos llevó a preguntarnos si las vesículas que transportan MAL hacia la SI estaban transportando también a las proteínas Lck y LAT. Para ello, se expresaron las proteínas Lck-Cherry o LAT-Cherry en células Jurkat J77 que expresaban la proteína GFP-MAL de manera estable y se realizaron experimentos de videomicroscopía con células Raji en presencia de SEE. En el caso de la proteína Lck-Cherry, se encontró que ésta se transporta en las mismas vesículas que llevan a la proteína MAL a la membrana (Figura 37A). La colocalización entre ambas proteínas se muestra en un diagrama (Figura 37B), siendo el coeficiente de correlación de Pearson y el de Manders, de 0,920 y 0,98 respectivamente. En el caso de la proteína LAT-Cherry, los experimentos *in vivo* muestran que, pese a que colocaliza con la proteína MAL tanto en el membrana plasmática como en el compartimento interno, las vesículas en las que MAL es transportado hacia al SI no contienen a LAT (figura 37C), que parece que es incluida en vesículas menos abundantes que lo que las que poseen MAL. En este caso, los coeficientes de correlación de Pearson y de Manders fueron de 0,757 y 0,565 respectivamente. De esta manera, podemos concluir que MAL está implicada en el tráfico polarizado de Lck hacia la SI. Un caso distinto es el de la proteína LAT, que si bien no es transportada directamente por MAL, su distribución en el SMAC es regulada por MAL.

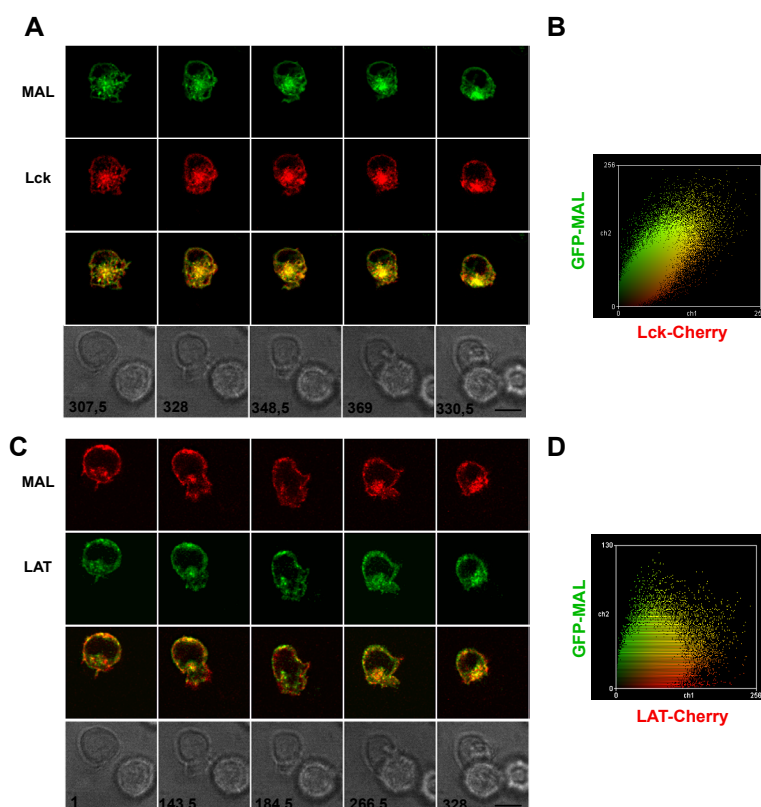


Figura 37. La proteína Lck viaja en las mismas vesículas que MAL hacia la SI. Las células Jurkat J77 que expresan establemente la proteína GFP-MAL fueron transfectadas con las quimeras Lck-Cherry (A y B) y LAT-Cherry (C y D) y adheridas sobre cristales recubiertos con fibrectina. Sobre ellas se añadieron células Raji cargadas con SEE. Las secuencias de imágenes corresponden a un experimento *in vivo* realizado en un microscopio confocal. Los paneles B y D muestran los diagramas de colocalización para MAL y Lck o LAT, respectivamente. Barra, 5 μ m. Los números muestran el tiempo en segundos.

14. La proteína MAL-FLAG afecta a las balsas de membrana presentes en la SI

Los 10 aminoácidos del extremo amino terminal de Lck fusionados a GFP (Lck₁₀-GFP) se miristoilan y palmitoilan como en el caso de la molécula Lck intacta, y son capaces de incorporar a la quimera en los DRMs (Shenoy-Scaria et al. 1993; Van Komen et al., 2007). Esta propiedad nos permitió utilizar a la proteína Lck₁₀-GFP a modo de “sonda” marcadora de balsas de membrana y poder comparar su distribución en las células Jurkat que expresan myc-MAL y MAL-FLAG. En las células que expresaban establemente la proteína myc-MAL, la quimera Lck₁₀-GFP se concentra preferentemente en el cSMAC, en las células que expresan la proteína MAL-FLAG se mostró enriquecida en el pSMAC (Figura 38A y B). Examinamos también la distribución del gangliósido GM1, marcador típico de balsas, en ambos tipos de células Jurkat. Análogamente a lo observado con la quimera Lck₁₀-GFP, GM1, que se encuentra normalmente en el cSMAC, se mostró enriquecido en el pSMAC en las células que expresan la proteína MAL con el último bucle extracelular mutado. En la figura 38C se muestra el resultado de este experimento, así como la cuantificación del mismo y del grado de enriquecimiento de GM1 en el pSMAC, empleando como control la proteína actina. Conjuntamente, los resultados obtenidos con la quimera Lck₁₀-GFP y el gangliósido GM1, nos sugieren que la proteína MAL-FLAG produce una deslocalización de las balsa lipídicas al pSMAC, donde la proteína MAL-FLAG resulta acumulada (Figura 38A-C).

Por último, analizamos si el defecto en la deslocalización de proteínas endógenas residente en las balsas de membrana era extensible a proteínas asociadas a balsas y expresadas de forma ectópica. Para ello, expresamos la proteína HA (hemaglutinina del virus *influenza*), como proteína ectópica prototípica asociada a balsas de membrana (Puertollano et al., 1999). De forma coherente con lo observado para Lck, LAT, Lck₁₀-GFP y GM1, la distribución de HA cambió del cSMAC en células Jurkat/MAL al pSMAC en células Jurkat MAL-FLAG (Figura 38E).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la modificación del último bucle extracelular de MAL causa la acumulación anómala de la proteína en el pSMAC, y esto ocasiona una deslocalización de las balsas de membrana, que pasan a concentrarse en el mismo lugar de la SI que la proteína MAL modificada.

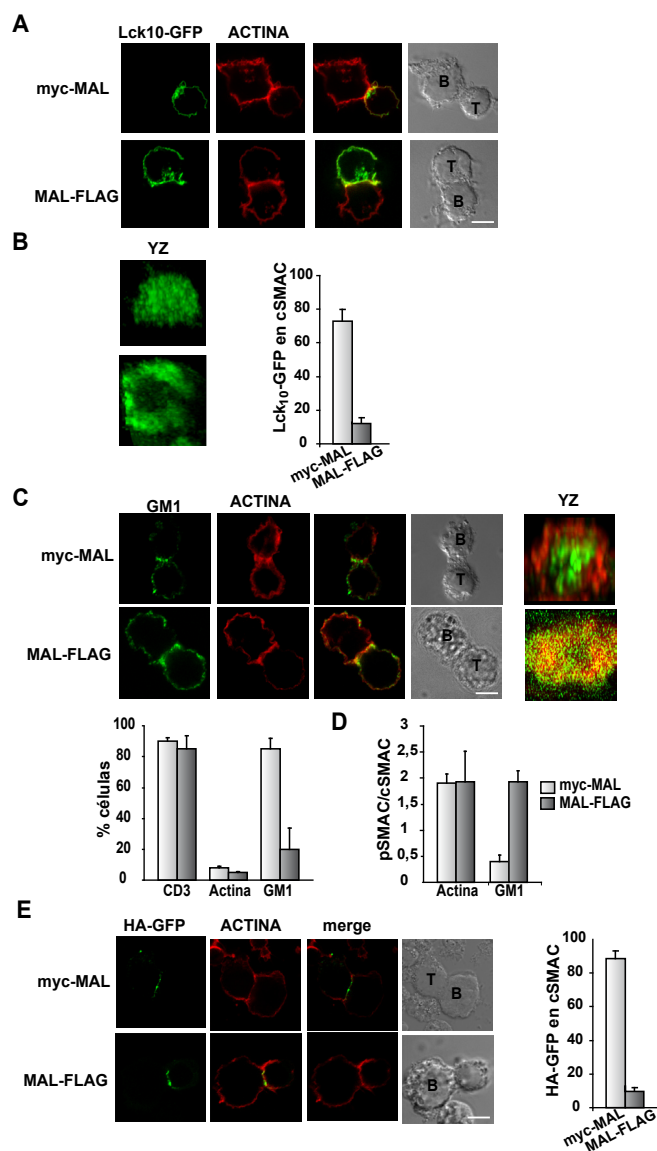


Figura 38. La expresión de la proteína MAL-FLAG afecta a la distribución de las balsas lipídicas en la SI. (A) Las células Jurkat que expresan establemente la proteína MAL o la proteína MAL-FLAG fueron transfectadas con la quimera Lck10-GFP. Tras 24 h de expresión, estas células fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE, fijadas, y la distribución de la Lck10-GFP en a SI analizada mediante microscopia confocal. (B) Reconstrucción ortogonal de la zona de la SI. El histograma muestra el porcentaje de conjugados con Lck10-GFP polarizado al cSMAC. (C) Células Jurkat myc-MAL y Jurkat MAL-FLAG fueron conjugadas durante 15 minutos con células Raji en presencia de SEE. Los conjugados fueron adheridos sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina. Estas células fueron incubadas con cantidad 5 mg/ml de toxina colérica durante 30 min a 4°C. Posteriormente, fueron fijados y permeabilizados para detectar la F-actina mediante incubación con faloidina. Se muestra también una visión ortogonal de la zona de la SI y dos histogramas. Uno muestra el porcentaje de células con CD3, actina o GM1 polarizados al cSMAC y el otro el una cuantificación del enriquecimiento de actina y GM1 representado como la relación entre la molécula presente en el pSMAC y en el cSMAC. (D) Cuantificación del enriquecimiento de actina y GM1 en el pSMAC con respecto al cSMAC en células Jurkat con expresión estable de myc-MAL o de MAL-FLAG. (E) La proteína fusión HA-GFP se expresó en células Jurkat con expresión estable de myc-MAL o de MAL-FLAG durante 24 h. Las células se conjugaron urante 15 min con células Raji en presencia de SEE, se fijaron y permeabilizaron. Se examinó la distribución de HA, y la de actina. El histograma muestra el porcentaje de células con HA polarizado al cSMAC. Barra, 5 μ m..

Discusión

DISCUSIÓN

1 El silenciamiento de la proteína MAL afecta a la formación de la SI en el linfocito T

La formación de la SI es un proceso altamente regulado que implica el ordenamiento espacial y temporal de receptores, moléculas de señalización y proteínas de citoesqueleto. El uso de células Jurkat como modelo de linfocito T ha permitido esclarecer muchos de los procesos de activación que tienen lugar tras la formación de la SI, debido en gran parte a la disposición de mutantes derivados de ellas. Aunque estas rutas de activación han sido diseccionadas en detalle, poco se sabe sobre los procesos que conllevan a la formación de una estructura tan organizada como es la SI. Los mecanismos de polarización y concentración de proteínas, así como la formación del patrón estructural característico del SMAC siguen siendo motivo de estudio.

La proteína MAL fue inicialmente clonada de linfocitos T (Alonso and Weissman, 1987), si bien su función en este tipo celular es todavía desconocida. La función de MAL ha sido ampliamente estudiada en células epiteliales polarizadas, donde se la muestra como un componente esencial de la maquinaria de tráfico apical de proteínas (Cheong et al., 1999; Puertollano et al., 1999).

El uso de técnicas basadas en el ARNi, así como la disposición de un mutante de células Jurkat carente de la expresión de MAL, permitió esclarecer la función de MAL durante la formación de la SI. El mutante JTIM fue aislado en el laboratorio del Dr. A. Weiss, donde previamente se habían aislado otros mutantes deficientes en activación como las células J.CAM1.6, carentes de la expresión de Lck (Goldsmith and Weiss, 1987; Straus and Weiss, 1992), o las células J.CAM2, deficientes en la expresión de LAT (Finco et al., 1998; Goldsmith et al., 1988). Los experimentos previos mostraron que el mutante JTIM era incapaz de activarse en respuesta a la presentación de un antígeno (SEE) mediante una APC. Proteínas tales como el complejo TCR/CD3, o las quinasas Lck, PKC θ y ZAP-70 no eran reclutadas a la zona de la SI. Como consecuencia de estas deficiencias, la células JTIM no mostraban los eventos típicos de activación más tardía, como la inducción de la transcripción de los genes de IL-2 y CD69.

Además de la redistribución de receptores, la formación de la SI conlleva la reorganización del citoesqueleto celular y la reorientación del MTOC, que controla el posicionamiento orientado hacia la SI de los compartimentos endocítico y secretor (Billadeau et al., 2007). Una parte de Lck y LAT se asocian a estas estructuras, y se translocan a la SI junto a estos compartimentos (Bonello et al., 2004; Ehrlich et al., 2002). En el caso de las células JTIM, donde el MTOC no se reorienta hacia la SI, también está afectado el tráfico polarizado desde este compartimento (Das et al., 2004). La polarización deficiente

de moléculas hacia la SI también fue observada en PBLs donde la proteína MAL había sido silenciada.

Continuando en esta línea, nosotros nos preguntamos si las observaciones realizadas con el mutante JTIM y células Raji en presencia de SEE, eran extensibles a otros sistemas de presentación antigénica. Para ello empleamos células Jurkat CH7C17, cuyo TCR responde específicamente a un péptido específico de HA y también al SEB al ser presentados por una APC. Silenciando MAL en estas células, los resultados observados fueron los mismos que con SEE, resultando ineficientes la polarización del complejo TCR/CD3 y del MTOC. De esta manera, se puede afirmar el requerimiento de MAL para los procesos que conllevan a la formación de la SI y a la activación del linfocito T como algo más general, independiente del sistema de presentación y del antígeno presentado.

Al contrario que en el caso de los humanos, los linfocitos T de ratón no expresan el gen de *MAL*. La explicación más plausible es que otro miembro de la familia MAL o de la superfamilia de proteínas con dominios MARVEL está asumiendo en el ratón la función que desempeña MAL en el humano.

2 La proteína MAL se asocia con Lck y permite su incorporación en las balsas lipídicas y su transporte a membrana.

Dada la función de MAL como parte de la maquinaria especializada del transporte apical en células epiteliales (Cheong et al., 1999; Martin-Belmonte et al., 2000; Puertollano et al., 1999), una posibilidad lógica era que MAL formara parte de una maquinaria especializada de transporte de membranas a la superficie de las células T (Alonso and Millan, 2001; Millan et al., 2002). Durante una búsqueda de proteínas cuya distribución en membrana plasmática estuviera afectada en ausencia de MAL, encontramos que la quinasa Lck se distribuía de forma anómala en las células JTIM y en PBLs con la expresión de MAL silenciada. Así, mientras que en células Jurkat Lck se distribuye en la periferia celular e, internamente, en un compartimento endosomal, en células JTIM Lck se quedaba en su mayor parte retenida intracelularmente. Cuando reconstituíamos exógenamente los niveles de MAL en estas células, Lck vuelve a recuperar su distribución original. Estos datos sugerían que la proteína MAL posiblemente participe de alguna manera en el transporte de Lck desde el compartimento interno hacia la membrana plasmática. Por otra parte, se sabe que Lck se transporta hacia la membrana plasmática a través de mecanismos de la ruta exocítica de tráfico de membranas (Bijlmakers and Marsh, 1999). Además, la presencia de Lck en estructuras endosomales y su colocalización con la proteína MAL era consistente con la hipótesis de la participación de MAL en la exocitosis de Lck. Esta hipótesis fue confirmada mediante experimentos de videomicroscopía, donde se observó que MAL y Lck viajaban en las mismas vesículas que partían desde el compartimento endosomal con destino a la

membrana plasmática. En células carentes de expresión de MAL, las vesículas con Lck son mucho más pequeñas y se producen esporádicamente. No obstante, la ausencia de MAL no produce un bloqueo general en las rutas de transporte exocítico, puesto que proteínas como la proteína transmembrana p75 o la quinasa Fyn se transportan eficientemente en vesículas hacia la membrana plasmática independientemente de la expresión de MAL.

Inicialmente, se postuló que las balsas de membrana estaban implicados en el tráfico apical (Simons and Wandinger-Ness, 1990). Aunque su existencia es controvertida (Munro, 2003), se asume que los DRMs están enriquecidos en estos microdominios (Hancock, 2006; Pike, 2006). Aproximadamente un 30-50% de Lck se concentra en los DRMs (Montixi et al., 1998; Xavier and Seed, 1999). De forma congruente con la colocalización de MAL y Lck en células Jurkat, ambas proteínas cofraccionan en los DRMs (Millan and Alonso, 1998). Un resultado especialmente llamativo que encontramos es que, en las células que no expresan la proteína MAL, Lck es incapaz de acceder a los DRMs, aunque sí parece asociarse a membranas.

A la vista de estas observaciones, se puede establecer un posible paralelismo entre el transporte dependiente de MAL en células Jurkat y células epiteliales. En células Jurkat, MAL es necesario para la inclusión de Lck en balsas lipídicas y su transporte hacia la membrana plasmática, de igual manera que el transporte polarizado a la superficie apical de la proteína HA y su inclusión en DRMs son dependientes de MAL en células MDCK (Puertollano et al., 1999). La asociación encontrada entre MAL y HA se interpretó desde el punto de vista de que una de las funciones de MAL era reclutar HA a los microdominios de membrana, paso necesario para su transporte polarizado hacia la membrana apical (Puertollano et al., 1999; Puertollano et al., 2001). De acuerdo con esto, el defecto observado en el transporte de Lck hacia la membrana plasmática en ausencia de MAL, puede ser explicado por la exclusión de Lck de las plataformas de membrana necesarias para su exocitosis. Debido a que MAL se asocia con Lck, y que la expresión exógena de MAL restituye completamente tanto el transporte de Lck como su incorporación a DRMs, una de las funciones de MAL en células T podría ser la de reclutar Lck a los microdominios de membrana necesarios para la formación de vesículas que transportan a esta quinasa a la membrana plasmática (Figura 42). Recientemente se ha involucrado a la proteína Unc119 como parte de la maquinaria proteica responsable del tráfico de Lck desde endosomas de reciclaje a la membrana plasmática (Gorska et al., 2009).

3 La expresión forzada de Lck en membrana en células carentes de MAL corrige una parte de defectos tempranos en la formación de la SI.

Se ha demostrado que la expresión de Lck en la membrana plasmática es esencial para la función de las células T, puesto que los mutantes de Lck que son incapaces de asociarse a

membranas son también defectivos en señalización (Kabouridis et al., 1997). Para analizar si la ausencia de Lck en la membrana plasmática podría justificar el fallo observado durante la formación de la SI en células carentes de MAL, se forzó la expresión de Lck en membrana plasmática mediante la expresión de las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck. La expresión de ambas quimeras consiguió rescatar la polarización del TCR y de las quinasas ZAP-70 y PKC θ a la SI, indicando que ambas formas transmembrana de Lck eran eficientes para restaurar la señalización inducida por el TCR en ausencia de MAL, independientemente de su nivel de inclusión en DRMs. No obstante, la expresión de ninguna de las dos quimeras fue capaz de restaurar la reorientación del MTOC u otros eventos tales como la fosforilación de ERK o la inducción de la expresión de CD69. Estos resultados indican que la ausencia de transporte de Lck a la membrana plasmática no es el único defecto existente en las células carentes de MAL, lo que supone que, además del transporte de Lck, MAL media otros funciones en la célula T.

Otra de las proteínas cuya polarización a la SI no fue reparada mediante la expresión de las quimeras de Lck fue el adaptador LAT. LAT es una proteína que es requerida para la señalización celular cuya función es servir como “scaffold”, para reclutar múltiples proteínas necesarias para la activación (Finco et al., 1998; Rudd, 1999; Zhang et al., 1999). LAT se palmitoila en dos residuos de cisteína próximos al dominio transmembrana, y se asocia constitutivamente a las balsas lipídicas. Esta localización en microdominios de membrana parece crucial para su propia fosforilación (Zhang et al., 1998a) y para su transporte a la membrana plasmática (Hundt et al., 2009; Tanimura et al., 2006), aunque existe controversia entre si la inclusión de LAT en las balsas es necesaria para la activación del linfocito (Lin et al., 1999) o su presencia en las mismas es dispensable para que se lleva a cabo la señalización (Hundt et al., 2009; Zhu et al., 2005). Subcelularmente, LAT se distribuye en dos compartimentos, presentándose una parte en endosomas de reciclaje, colocalizando con transferrina, y otra parte en la membrana plasmática. Cuando se forma la SI, ambos compartimentos están involucrados en el reclutamiento de LAT a la misma (Bonello et al., 2004). Contrariamente a lo que ocurre con Lck en las células carentes de MAL, LAT no mostró cambios en su solubilidad y siguió fraccionando en los DRMs. Su distribución subcelular y tráfico vesicular tampoco se vieron afectados en ausencia de MAL. Por otra parte, tanto en las células JTIM como en las células suprimidas de MAL, LAT no se concentraba en la zona del contacto con la APC en presencia de SEE. Este defecto no fue corregido cuando se expresaron las quimeras CD4/Lck o LAT/Lck, lo que indica que no se trataba de un efecto inducido causado por la ausencia de Lck en membrana, sino ante un defecto ocasionado por la falta de MAL en estas células.

4 **La proteína MAL se trasloca a la SI**

La generación de una respuesta frente a un antígeno presentado requiere de un sistema especializado de comunicación entre la célula T y la APC basado en el contacto físico entre las células y en la acción de factores solubles, principalmente citoquinas. La interacción célula T-APC implica distintos eventos de reconocimiento molecular que se producen de manera secuencial. En un primer paso, la célula T migra hacia la APC y se produce un primer evento de adhesión mediado por ICAM-3 y que supone su redistribución hacia la zona de contacto (Montoya et al., 2002). Esto supone la aproximación de las membranas de ambas células, facilitando el rastreo mediado por el TCR en busca de un antígeno específico presentado por el MHC de la APC. Si se produce el reconocimiento antigénico, el TCR contactado comienza a enviar señales, que inducirían la activación de integrinas tipo LFA-1, la estabilización del conjugado T-APC (Dustin and Springer, 1989; van Kooyk et al., 1989) y la consiguiente formación de la SI.

La formación de la SI es un proceso perfectamente regulado que supone una polarización y ordenamiento de receptores, proteínas de citoesqueleto y otras moléculas implicadas en señalización. De esta forma el linfocito T, una célula esférica y sin polaridad aparente, adquiere, mediante la formación de la SI, un fenotipo polarizado.

Para explicar la concentración de todas las proteínas de membrana en la SI se han propuesto varias rutas, incluyendo la difusión lateral por la membrana, movimiento mediado por citoesqueleto o transporte vesicular asociado al tráfico desde compartimentos intracelulares. La participación de las balsas lipídicas de membrana en el ensamblaje de los componentes de la SI ha sido un tema controvertido (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998) .

Hasta ahora, la proteína MAL había sido implicada en el transporte de proteínas cargo hacia la membrana plasmática (HA en epitelio (Puertollano et al., 1999) y Lck en el linfocito), mediando el reclutamiento de las mismas a las balsas lipídicas. El hecho de que la expresión de las quimeras CD4/Lck y LAT/Lck no corrigieran todos los defectos en la formación de la SI en las células carentes de MAL, nos sugería que, además del transporte de Lck a la membrana plasmática en el linfocito T, MAL podría desempeñar otras funciones durante la formación de la SI. De hecho, en experimentos de videomicroscopía, MAL se mostró como una molécula dinámica, que se traslocaba rápidamente en vesículas que emergían del compartimento intracelular a la zona de contacto formada por la célula T y la APC y se concentraba en el cSMAC. Es en esta zona donde se concentran proteínas asociadas a balsas lipídicas como Lck y LAT, así como el gangliósido GM1. Sorprendentemente, MAL también se acumula en el contacto con la APC cuando no existe antígeno. En este caso, el contacto entre ambas células es transitorio, pero al no existir reconocimiento antigénico, la señal no evoluciona ni se mantiene en el tiempo y el contacto se acaba perdiendo. Quizás esta débil señal inicial sea capaz de desencadenar la polarización de ciertas moléculas, MAL

entre ellas, al sitio de contacto, pero, al no existir señal por parte de TCR, no se produce la estabilización en la membrana del material proteico ya aportado, ni tampoco continúa el proceso de formación de la SI.

5 **Las balsas de membrana en la organización de la SI**

Además del patrón proteico ordenado y característico que presenta la SI, la membrana plasmática presenta una composición lipídica más ordenada en la zona de contacto con la APC (Gaus et al., 2005). Ha quedado patente, en este trabajo y en trabajos anteriores (Anton et al., 2008; Puertollano et al., 1999), la capacidad de MAL para organizar las balsas lipídicas y seleccionar las proteínas cargo que serán reclutadas a las mismas. Por ello, no es muy descabellado pensar que MAL podía desempeñar alguna función similar durante la formación de la SI.

Se ha postulado que las balsas podrían tener un papel importante en el reclutamiento específico de receptores y moléculas de señalización. En el caso de la SI, esta hipótesis se sustenta en varias evidencias:

- 1) Muchos receptores de membrana, entre ellos el complejo TCR/CD3, que normalmente se encuentran excluidas de estos microdominios, acceden a los DRMs tras la estimulación (Montixi et al., 1998; Xavier et al., 1998).
- 2) Algunas moléculas de especial relevancia en la activación de la célula T, como Lck y LAT, residen constitutivamente en estos microdominios (Xavier et al., 1998; Zhang et al., 1998b).
- 3) La desorganización de las balsas lipídicas causada por la eliminación de colesterol (Xavier et al., 1998) o por modificaciones en la composición de lípidos (Stulnig et al., 1998) inhiben los eventos tempranos en la formación de la SI.
- 4) La SI es más ordenada que el resto de la membrana (Gaus et al., 2005) y el gangliósido GM1, marcador típico de balsas de membrana, está enriquecido en el cSMAC (Burack et al., 2002).

La implicación de las balsas lipídicas en la formación de la SI fue cuestionada por los experimentos que indicaban que las interacciones proteína-proteína eran suficientes para explicar el ensamblaje de la maquinaria de señalización en el cSMAC (Douglass and Vale, 2005). No obstante, estos estudios no invalidan la posibilidad de que las balsas lipídicas sean el microambiente donde se ensambla el cSMAC. Nuestros resultados son congruentes con el hecho de la presencia de dominios de membrana más ordenados en el cSMAC, ya que es en esta zona donde se concentra la molécula MAL, que se asocia de forma constitutiva a los DRMs.

El perfil de hidrofobicidad de MAL predice 4 segmentos hidrofóbicos separados por tres bucles hidrofílicos. Esto puede corresponder a una proteína con cuatro dominios

transmembrana y los extremos amino y carboxilo terminales orientados hacia el mismo lado de la membrana. Como el extremo aminoterminal es sólo accesible cuando se permeabiliza la célula, el último bucle debería ser extracelular si se asume la topología anteriormente descrita. Un resultado relevante fue que la interrupción de este último bucle hidrofílico de MAL, provocó una deslocalización de la molécula al pSMAC. No resulta fácil al explicación de cómo esta modificación causa un cambio tan brusco en la localización de la molécula en el SMAC. Una posibilidad es que el conjunto de la molécula interaccione con otras proteínas que estabilicen MAL en el cSMAC y que su modificación, mediante la inserción de una secuencia ectópica, interfiera con esta interacción (Figura 39A). Otra posibilidad es que, de modo semejante a lo que se ha postulado para otro tipo de maquinaria proteica implicada en la generación de curvatura en la membrana, como las flotilinas y los reticulones, el proteolípido MAL sea capaz de adoptar diferentes conformaciones en la membrana, y la modificación del último bucle restrinja esta capacidad (Figura 39B). De hecho, se ha postulado que los proteolípidos pueden desempeñar un papel importante en procesos que conducen a la fusión de membranas (Zimmerberg, 2001).

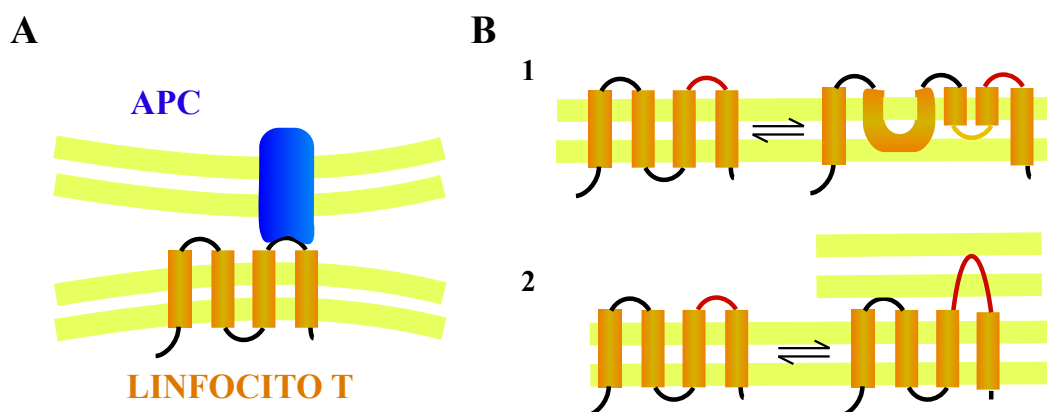


Figura 39. Posible papel del último bucle hidrofílico en la estructura de la proteína MAL. Una posibilidad es que el último bucle extracelular de la proteína MAL se una a alguna proteína de superficie presente en la célula presentadora (A), o que la integridad del mismo sea necesaria para que la molécula adopte diferentes conformaciones (B). También se podría pensar en un modelo flexible para la estructura de MAL de forma que durante los procesos que supongan la yuxtaposición o fisión de membranas, una parte de la molécula se inserte en la membrana adyacente. En todos los ejemplos, se ha dibujado el bucle referido en rojo.

La deslocalización de MAL al pSMAC conlleva una deslocalización de Lck y LAT, proteínas asociadas a las balsas lipídicas, a la misma zona, afectando así al patrón arquitectural de la SI. Curiosamente, también deslocaliza el gangliósido GM1 al pSMAC, sugiriendo una posible función de MAL en la organización de la arquitectura de la SI. por mediación de la organización de las balsas lipídicas acumuladas en ella. Esta organización afecta directamente a proteínas presentes en estos microdominios, como Lck y LAT. Consistente con esta observación, recientemente se ha implicado a MAL como componente clave para la

organización de dominios de membrana que podrían servir como plataformas de transporte especializado (Magal et al., 2009).

6 ¿Para qué sirve la SI?

El alto grado de ordenamiento y segregación de proteínas en la SI sugiere que esta estructura podría ser necesaria para la función del linfocito T en respuesta a un antígeno y más concretamente para el proceso de señalización. Sin embargo, una serie de evidencias como la existencia de sinapsis multifocales (Dustin et al., 2006) o que el inicio de la señalización mediada por el TCR ocurra antes del ensamblaje de la SI (Lee et al., 2002), descartaron esta idea. Actualmente, se acepta que el inicio de la señalización ocurre en microagrupamientos (“microclusters”) que activa al TCR contactado, y a la quinasa ZAP-70 y a los cuales se reclutan LAT y SLP-76. Incluso se ha demostrado su asociación con WASP y el citoesqueleto de actina (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Nuestros resultados son consecuentes con estas observaciones, puesto que, la proteína MAL con el último bucle modificado cambia la arquitectura de la SI, y aunque deslocaliza ciertas proteínas necesarias para la señalización, no se observa que esta organización anómala afecte a la activación temprana del linfocito T, como queda demostrado por la inducción de la fosforilación de CD3 ζ , ZAP-70, PLC γ y ERK, ni a su activación tardía, como refleja la inducción de la expresión de CD69 en la membrana celular.

Otra hipótesis en torno a la función de la SI, es la de sostener la señalización en el tiempo, haciendo coincidir espacialmente al TCR y al MHC en el cSMAC (Grakoui et al., 1999). Las concentración elevada de ambos complejos, facilitarían su inducción y producirían señales que mantendrían la activación durante tiempos mayores. No obstante, esta hipótesis también quedó cuestionada cuando se observó que, aún en sinapsis maduras, las señales de sostenimiento era aportadas por microclusters de TCR que reconocen en la periferia el antígeno presentado por la APC y migran hacia el centro del contacto (Grakoui et al., 1999).

Otra función propuesta para el cSMAC, es la de ser el lugar donde se induce el proceso que conduce a la degradación del TCR y de otras moléculas implicadas en señalización (Lee et al., 2003). El TCR sería internado, vía vesículas recubiertas de clatrina (Crotzer et al., 2004) y después degradado por dos rutas diferentes, bien por el lisosoma o bien por el proteasoma. En las sinapsis cuya organización se vió afectada por la expresión de la proteína MAL modificada en su último bucle, la internación y desaparición del TCR no se vieron afectadas. Esto indica que estos procesos no dependen del ensamblaje correcto del SMAC. Puesto que LAT se endocita en la SI de manera independiente de clatrina y dependiente de balsas lipídicas (Barr et al., 2006), sería interesante comprobar si LAT se sigue internando de forma similar en las células Jurkat que expresan MAL-FLAG.

Una última hipótesis es que el cSMAC determina la orientación para la secreción direccionada de citoquinas y polarización de sus receptores, consiguiendo así una señal más eficaz (Molon et al., 2005). En las sinapsis citolíticas, el cSMAC determinaría la orientación para la secreción de gránulos citolíticos (Huse et al., 2008; Stinchcombe et al., 2006).

7 Paralelismo en las rutas de transporte especializado en el linfocito T y la célula epitelial. Función de MAL

Los datos expuestos sugieren que las funciones mediadas por MAL en el linfocito T son semejantes a las que lleva a cabo en la célula epitelial polarizada. En el linfocito T en reposo, célula aparentemente no polarizada, MAL es la encargada de reclutar Lck a las balsas lipídicas y transportarla hacia la membrana plasmática (Figura 42). Cuando el linfocito T se polariza y forma una SI, MAL transporta a Lck a la SI, de forma análoga a como MAL transporta a HA a la superficie apical de las células epiteliales polarizadas. En el caso de los linfocitos T, MAL podría desempeñar una segunda función organizando las balsas de membrana en el SMAC y controlando de esta forma la distribución de ciertas moléculas asociadas a estos microdominios, como Lck y LAT. Es posible que MAL desempeñe una función similar en la membrana apical, sin embargo, este aspecto sigue sin investigar. Estas observaciones sugieren un paralelismo en las rutas de transporte polarizado existentes en el epitelio y en el linfocito T (Ludford-Menting et al., 2005) (Figura 40).

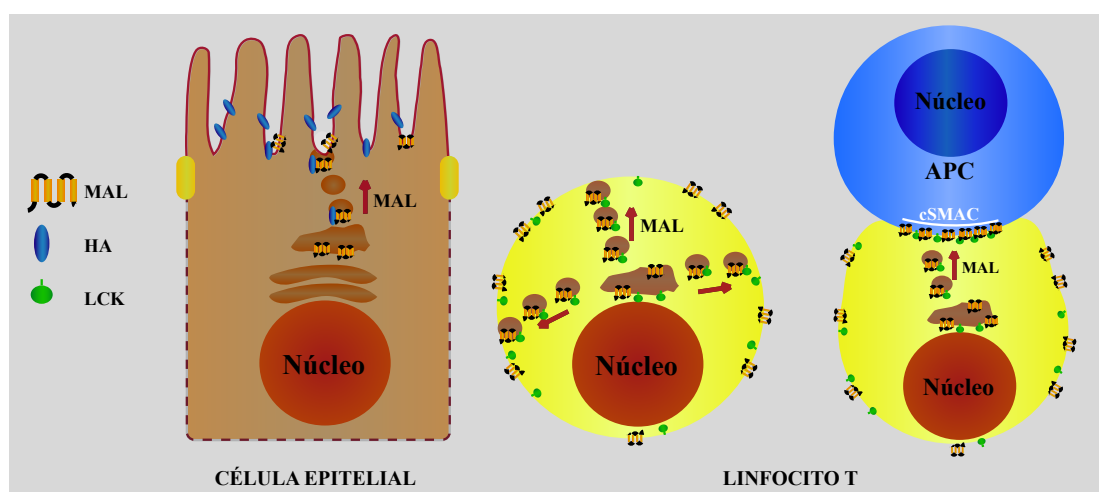


Figura 40. Paralelismo en el transporte mediado por MAL en el epitelio y en el linfocito T. En células epiteliales MAL forma parte de la maquinaria que media el transporte de HA a la membrana apical. En este proceso, también juegan un papel importante las balsas lipídicas, actuando como plataformas de reclutamiento de las proteínas cargo. En el linfocito T en reposo, MAL media el transporte de Lck a la membrana plasmática, siendo necesaria la inclusión de la Lck en las balsas de membrana para que este transporte se lleve cabo de forma eficiente. En las células activadas con una APC, MAL parece transportar Lck de forma polarizada a la SI y organiza las balsas de membrana existentes en el cSMAC y con ello el reclutamiento y distribución de las proteínas en la misma.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La proteína MAL colocaliza con la proteína Lck en la membrana plasmática y en el compartimento endosomal.
2. La proteína MAL se asocia a la proteína Lck siendo suficiente los 10 aminoácidos del extremo amino terminal de la quinasa para que se dé la interacción.
3. La proteína MAL es necesaria para la inclusión de Lck en las balsas de membrana.
4. La proteína MAL viaja en las mismas vesículas que transportan Lck a la membrana plasmática y es necesaria para la formación de las mismas.
5. La falta de expresión de MAL ocasiona defectos en la traslocación del TCR, Lck LAT y el centro organizador de microtúbulos a la sinapsis inmunitaria. El defecto observado en la traslocación del TCR, pero no de LAT o del MTOC, ES corregido por la expresión de Lck en la membrana plasmática.
6. La proteína MAL se concentra en la zona de la sinapsis inmunitaria tanto en presencia como en ausencia de superantígeno E debido, al menos en parte, al material aportado en vesículas desde compartimentos internos.
7. La proteína MAL viaja en las mismas vesículas que transportan a la tirosina quinasa Lck a la sinapsis inmunitaria.
8. La proteína MAL parece desempeñar un papel importante en la organización estructural del SMAC, siendo responsable de la distribución correcta de las balsas de membrana en dicho complejo.
9. La proteína MAL, posiblemente mediante su efecto sobre las balsas de membrana, controla el lugar ocupado por la tirosina quinasa Lck y la proteína adaptadora LAT dentro del SMAC.

En resumen, la proteína MAL parece desempeñar una función importante en la estructuración de las balsas de membrana de los linfocitos T, organizándolas para hacerlas funcionales en procesos de transporte a la superficie celular y en el ensamblaje del complejo supramolecular de activación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M. A., Barton, D. E., and Francke, U. (1988). Assignment of the T-cell differentiation gene MAL to human chromosome 2, region cen----q13. *Immunogenetics* 27, 91-95.
- Alonso, M. A., and Millan, J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114, 3957-3965.
- Alonso, M. A., and Weissman, S. M. (1987). cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1997-2001.
- Anton, O., Batista, A., Millan, J., Andres-Delgado, L., Puertollano, R., Correas, I., and Alonso, M. A. (2008). An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *J Exp Med* 205, 3201-3213.
- Arpaia, E., Shahrar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C. M. (1994). Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell* 76, 947-958.
- Balogopalan, L., Barr, V. A., Sommers, C. L., Barda-Saad, M., Goyal, A., Isakowitz, M. S., and Samelson, L. E. (2007). c-Cbl-mediated regulation of LAT-nucleated signaling complexes. *Mol Cell Biol* 27, 8622-8636.
- Barr, V. A., Balagopalan, L., Barda-Saad, M., Polishchuk, R., Boukari, H., Bunnell, S. C., Bernot, K. M., Toda, Y., Nossal, R., and Samelson, L. E. (2006). T-cell antigen receptor-induced signaling complexes: internalization via a cholesterol-dependent endocytic pathway. *Traffic* 7, 1143-1162.
- Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M. A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 172, 6709-6714.
- Bauer, M., and Pelkmans, L. (2006). A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett* 580, 5559-5564.
- Bergman, M., Mustelin, T., Oetken, C., Partanen, J., Flint, N. A., Amrein, K. E., Autero, M., Burn, P., and Alitalo, K. (1992). The human p50csk tyrosine kinase phosphorylates p56lck at Tyr-505 and down regulates its catalytic activity. *Embo J* 11, 2919-2924.
- Bijlmakers, M. J., and Marsh, M. (1999). Trafficking of an acylated cytosolic protein: newly synthesized p56(lck) travels to the plasma membrane via the exocytic pathway. *J Cell Biol* 145, 457-468.
- Billadeau, D. D., Nolz, J. C., and Gomez, T. S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7, 131-143.
- Bolte, S., and Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-232.
- Bonello, G., Blanchard, N., Montoya, M. C., Aguado, E., Langlet, C., He, H. T., Nunez-Cruz, S., Malissen, M., Sanchez-Madrid, F., Olive, D., *et al.* (2004). Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci* 117, 1009-1016.
- Brown, D. A., and London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* 240, 1-7.
- Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-17224.

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Bunnell, S. C., Hong, D. I., Kardon, J. R., Yamazaki, T., McGlade, C. J., Barr, V. A., and Samelson, L. E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 158, 1263-1275.
- Bunnell, S. C., Singer, A. L., Hong, D. I., Jacque, B. H., Jordan, M. S., Seminario, M. C., Barr, V. A., Koretzky, G. A., and Samelson, L. E. (2006). Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation. *Mol Cell Biol* 26, 7155-7166.
- Burack, W. R., Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., and Shaw, A. S. (2002). Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* 169, 2837-2841.
- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M. L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* 202, 1031-1036.
- Cerny, J., Stockinger, H., and Horejsi, V. (1996). Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins. *Eur J Immunol* 26, 2335-2343.
- Crotzer, V. L., Mabardy, A. S., Weiss, A., and Brodsky, F. M. (2004). T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization. *J Exp Med* 199, 981-991.
- Cheong, K. H., Zacchetti, D., Schneeberger, E. E., and Simons, K. (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6241-6248.
- D'Oro, U., and Ashwell, J. D. (1999). Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J Immunol* 162, 1879-1883.
- Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M. I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* 20, 577-588.
- Douglass, A. D., and Vale, R. D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121, 937-950.
- Dustin, M. L., and Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624.
- Dustin, M. L., Tseng, S. Y., Varma, R., and Campi, G. (2006). T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol* 18, 512-516.
- Ehrlich, L. I., Ebert, P. J., Krummel, M. F., Weiss, A., and Davis, M. M. (2002). Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* 17, 809-822.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998). LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Foster, L. J., De Hoog, C. L., and Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5813-5818.

- Freeburn, R. W., Wright, K. L., Burgess, S. J., Astoul, E., Cantrell, D. A., and Ward, S. G. (2002). Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol* 169, 5441-5450.
- Gaus, K., Chklovskaya, E., Fazekas de St Groth, B., Jessup, W., and Harder, T. (2005). Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J Cell Biol* 171, 121-131.
- Gaus, K., Zech, T., and Harder, T. (2006). Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Mol Membr Biol* 23, 41-48.
- Gerke, V., Creutz, C. E., and Moss, S. E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.
- Gillis, S., and Watson, J. (1980). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152, 1709-1719.
- Goldsmith, M. A., Dazin, P. F., and Weiss, A. (1988). At least two non-antigen-binding molecules are required for signal transduction by the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8613-8617.
- Goldsmith, M. A., and Weiss, A. (1987). Isolation and characterization of a T-lymphocyte somatic mutant with altered signal transduction by the antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6879-6883.
- Gomez, T. S., Kumar, K., Medeiros, R. B., Shimizu, Y., Leibson, P. J., and Billadeau, D. D. (2007). Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity* 26, 177-190.
- Gorska, M. M., Liang, Q., Karim, Z., and Alam, R. (2009). Uncoordinated 119 protein controls trafficking of Lck via the Rab11 endosome and is critical for immunological synapse formation. *J Immunol* 183, 1675-1684.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Hailman, E., Burack, W. R., Shaw, A. S., Dustin, M. L., and Allen, P. M. (2002). Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* 16, 839-848.
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 456-462.
- Harder, T., Rentero, C., Zech, T., and Gaus, K. (2007). Plasma membrane segregation during T cell activation: probing the order of domains. *Curr Opin Immunol* 19, 470-475.
- Heerklotz, H. (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J* 83, 2693-2701.
- Hundt, M., Harada, Y., De Giorgio, L., Tanimura, N., Zhang, W., and Altman, A. (2009). Palmitoylation-dependent plasma membrane transport but lipid raft-independent signaling by linker for activation of T cells. *J Immunol* 183, 1685-1694.
- Huse, M., Lillemeier, B. F., Kuhns, M. S., Chen, D. S., and Davis, M. M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* 7, 247-255.
- Huse, M., Quann, E. J., and Davis, M. M. (2008). Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nat Immunol* 9, 1105-1111.
- Kabouridis, P. S., Magee, A. I., and Ley, S. C. (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *Embo J* 16, 4983-4998.

- Kasahara, K., Nakayama, Y., Sato, I., Ikeda, K., Hoshino, M., Endo, T., and Yamaguchi, N. (2007). Role of Src-family kinases in formation and trafficking of macropinosomes. *J Cell Physiol* 211, 220-232.
- Kim, T., Fiedler, K., Madison, D. L., Krueger, W. H., and Pfeiffer, S. E. (1995). Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 42, 413-422.
- Kretzner, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., and Rodriguez-Boulant, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* 2, 125-127.
- Krummel, M. F., Sjaastad, M. D., Wulfig, C., and Davis, M. M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289, 1349-1352.
- Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T. N., Burack, W. R., Wu, H., Wang, J., *et al.* (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218-1222.
- Lee, K. H., Holdorf, A. D., Dustin, M. L., Chan, A. C., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Li, H., Llera, A., Malchiodi, E. L., and Mariuzza, R. A. (1999). The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* 17, 435-466.
- Lin, J., and Weiss, A. (2001). Identification of the minimal tyrosine residues required for linker for activation of T cell function. *J Biol Chem* 276, 29588-29595.
- Lin, J., Weiss, A., and Finco, T. S. (1999). Localization of LAT in glycolipid-enriched microdomains is required for T cell activation. *J Biol Chem* 274, 28861-28864.
- Lind, G. E., Ahlquist, T., and Lothe, R. A. (2007). DNA hypermethylation of MAL: a promising diagnostic biomarker for colorectal tumors. *Gastroenterology* 132, 1631-1632; author reply 1632.
- Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., *et al.* (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22, 737-748.
- Magal, L. G., Yaffe, Y., Shepshelovich, J., Aranda, J. F., de Marco Mdel, C., Gaus, K., Alonso, M. A., and Hirschberg, K. (2009). Clustering and lateral concentration of raft lipids by the MAL protein. *Mol Biol Cell* 20, 3751-3762.
- Martin-Belmonte, F., Alonso, M. A., Zhang, X., and Arvan, P. (2000a). Thyroglobulin is selected as luminal protein cargo for apical transport via detergent-resistant membranes in epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 41074-41081.
- Martin-Belmonte, F., Martinez-Menarguez, J. A., Aranda, J. F., Ballesta, J., de Marco, M. C., and Alonso, M. A. (2003). MAL regulates clathrin-mediated endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 163, 155-164.
- Martin-Belmonte, F., Puertollano, R., Millan, J., and Alonso, M. A. (2000b). The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell* 11, 2033-2045.
- Millan, J., and Alonso, M. A. (1998). MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases. *Eur J Immunol* 28, 3675-3684.

- Millan, J., Montoya, M. C., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M. A. (2002). Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood* 99, 978-984.
- Millan, J., Puertollano, R., Fan, L., and Alonso, M. A. (1997a). Caveolin and MAL, two protein components of internal detergent-insoluble membranes, are in distinct lipid microenvironments in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 233, 707-712.
- Millan, J., Puertollano, R., Fan, L., Rancano, C., and Alonso, M. A. (1997b). The MAL proteolipid is a component of the detergent-insoluble membrane subdomains of human T-lymphocytes. *Biochem J* 321 (Pt 1), 247-252.
- Millan, J., Qaidi, M., and Alonso, M. A. (2001). Segregation of co-stimulatory components into specific T cell surface lipid rafts. *Eur J Immunol* 31, 467-473.
- Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A. C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6, 465-471.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A., and Kupfer, A. (1997). Selective modulation of protein kinase C- θ during T-cell activation. *Nature* 385, 83-86.
- Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998). Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17, 5334-5348.
- Montoya, M. C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H. T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3, 159-168.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- Parton, R. G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 185-194.
- Penninger, J. M., Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., and Oliveira-dos-Santos, A. J. (2001). CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol* 2, 389-396.
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47, 1597-1598.
- Poo, W. J., Conrad, L., and Janeway, C. A., Jr. (1988). Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 332, 378-380.
- Puertollano, R., and Alonso, M. A. (1999). MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycles between the trans-Golgi network and the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 10, 3435-3447.
- Puertollano, R., Martin-Belmonte, F., Millan, J., de Marco, M. C., Albar, J. P., Kremer, L., and Alonso, M. A. (1999). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 145, 141-151.
- Puertollano, R., Martinez-Menarguez, J. A., Batista, A., Ballesta, J., and Alonso, M. A. (2001). An intact dilysine-like motif in the carboxyl terminus of MAL is required for normal apical transport of the influenza virus hemagglutinin cargo protein in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 12, 1869-1883.

- Rancano, C., Rubio, T., Correas, I., and Alonso, M. A. (1994). Genomic structure and subcellular localization of MAL, a human T-cell-specific proteolipid protein. *J Biol Chem* 269, 8159-8164.
- Rentero, C., Zech, T., Quinn, C. M., Engelhardt, K., Williamson, D., Grewal, T., Jessup, W., Harder, T., and Gaus, K. (2008). Functional implications of plasma membrane condensation for T cell activation. *PLoS One* 3, e2262.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.
- Rodgers, W., Crise, B., and Rose, J. K. (1994). Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol* 14, 5384-5391.
- Roose, J. P., Diehn, M., Tomlinson, M. G., Lin, J., Alizadeh, A. A., Botstein, D., Brown, P. O., and Weiss, A. (2003). T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol* 1, E53.
- Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2, 582-592.
- Rudd, C. E. (1999). Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* 96, 5-8.
- Sanchez-Pulido, L., Martin-Belmonte, F., Valencia, A., and Alonso, M. A. (2002). MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci* 27, 599-601.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.
- Shan, X., Czar, M. J., Bunnell, S. C., Liu, P., Liu, Y., Schwartzberg, P. L., and Wange, R. L. (2000). Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol* 20, 6945-6957.
- Shaw, A. S. (2001). FERMin'g up the synapse. *Immunity* 15, 683-686.
- Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S., and Lublin, D. M. (1993). Palmitylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* 13, 6385-6392.
- Sicheri, F., and Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 777-785.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Simons, K., and Wandinger-Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62, 207-210.
- Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G. M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462-465.
- Stoddart, A., Dykstra, M. L., Brown, B. K., Song, W., Pierce, S. K., and Brodsky, F. M. (2002). Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* 17, 451-462.

- Straus, D. B., and Weiss, A. (1992). Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70, 585-593.
- Stulnig, T. M., Berger, M., Sigmund, T., Raederstorff, D., Stockinger, H., and Waldhausl, W. (1998). Polyunsaturated fatty acids inhibit T cell signal transduction by modification of detergent-insoluble membrane domains. *J Cell Biol* 143, 637-644.
- Tanimura, N., Saitoh, S., Kawano, S., Kosugi, A., and Miyake, K. (2006). Palmitoylation of LAT contributes to its subcellular localization and stability. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1177-1183.
- Van Komen, J. S., Mishra, S., Byrum, J., Chichili, G. R., Yaciuk, J. C., Farris, A. D., and Rodgers, W. (2007). Early and dynamic polarization of T cell membrane rafts and constituents prior to TCR stop signals. *J Immunol* 179, 6845-6855.
- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T. W., and Figdor, C. G. (1989). Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342, 811-813.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M. L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117-127.
- Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798-801.
- Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4, 110-122.
- von Haller, P. D., Donohoe, S., Goodlett, D. R., Aebersold, R., and Watts, J. D. (2001). Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* 1, 1010-1021.
- Williams, B. L., Schreiber, K. L., Zhang, W., Wange, R. L., Samelson, L. E., Leibson, P. J., and Abraham, R. T. (1998). Genetic evidence for differential coupling of Syk family kinases to the T-cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol Cell Biol* 18, 1388-1399.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8, 723-732.
- Xavier, R., and Seed, B. (1999). Membrane compartmentation and the response to antigen. *Curr Opin Immunol* 11, 265-269.
- Xu, H., and Littman, D. R. (1993). A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 74, 633-643.
- Yamaguchi, H., and Hendrickson, W. A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature* 384, 484-489.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M. L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* 6, 1253-1262.
- Zacchetti, D., Peranen, J., Murata, M., Fiedler, K., and Simons, K. (1995). VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS Lett* 377, 465-469.
- Zech, T., Ejsing, C. S., Gaus, K., de Wet, B., Shevchenko, A., Simons, K., and Harder, T. (2009). Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *Embo J* 28, 466-476.

- Zhang, W., Irvin, B. J., Triple, R. P., Abraham, R. T., and Samelson, L. E. (1999). Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol* 11, 943-950.
- Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Triple, R. P., and Samelson, L. E. (1998a). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhang, W., Triple, R. P., and Samelson, L. E. (1998b). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.
- Zhu, M., Shen, S., Liu, Y., Granillo, O., and Zhang, W. (2005). Cutting Edge: Localization of linker for activation of T cells to lipid rafts is not essential in T cell activation and development. *J Immunol* 174, 31-35.
- Zimmerberg, J. (2001). How can proteolipids be central players in membrane fusion? *Trends Cell Biol* 11, 233-235.

An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes

Olga Antón,¹ Alicia Batista,¹ Jaime Millán,¹ Laura Andrés-Delgado,¹ Rosa Puertollano,² Isabel Correas,¹ and Miguel A. Alonso¹

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

²Laboratory of Cell Biology, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892

The MAL protein is an essential component of the specialized machinery for apical targeting in epithelial cells. The src family kinase Lck plays a pivotal role in T cell signaling. We show that MAL is required in T cells for efficient expression of Lck at the plasma membrane and activation of *IL-2* transcription. To investigate the mechanism by which MAL regulates Lck targeting, we analyzed the dynamics of Lck and found that it travels to the plasma membrane in specific transport carriers containing MAL. Coimmunoprecipitation experiments indicated an association of MAL with Lck. Both carrier formation and partitioning of Lck into detergent-insoluble membranes were ablated in the absence of MAL. Polarization of T cell receptor for antigen (TCR) and microtubule-organizing center to immunological synapse (IS) were also defective. Although partial correction of the latter defects was possible by forced expression of Lck at the plasma membrane, their complete correction, formation of transport vesicles, partitioning of Lck, and restoration of signaling pathways, which are required for *IL-2* transcription up-regulation, were achieved by exogenous expression of MAL. We concluded that MAL is required for recruitment of Lck to specialized membranes and formation of specific transport carriers for Lck targeting. This novel transport pathway is crucial for TCR-mediated signaling and IS assembly.

CORRESPONDENCE

Miguel A. Alonso:
maalonso@cbm.uam.es

Abbreviations used: IS, immunological synapse; JTIM, Jurkat TCR-signaling impaired mutant; mRNA, messenger RNA; MTOC, microtubule-organizing center; SEE, staphylococcal enterotoxin E; siRNA, short interfering RNA.

Induction of tyrosine phosphorylation by the TCR is essential for proliferation and differentiation of resting T cells into effector cells. One of the earliest intracellular modifications of downstream TCR recognition is the activation of the src family kinase Lck, which phosphorylates tyrosine residues of CD3, ZAP-70, and other substrates that initiate signaling cascades leading to T cell activation and proliferation (1). In the absence of Lck, the TCR fails to induce any tyrosine phosphorylation and all downstream signaling events are blocked (2, 3). Lck is predominantly associated with the cytosolic side of the plasma membrane, a localization which is consistent with its importance in the early signaling events involving the TCR (4). The N-terminal Gly-Cys-Val-Cys sequence of Lck is modified by the addition of myristate and palmitate to the glycine and the two cysteine residues, respectively (5). Transport of Lck

to the plasma membrane relies on the exocytic pathway (6) and requires acylation of its N-terminal sequence (7). Lck acylation is also essential for activation of downstream signaling pathways (7) and partitioning into detergent-resistant membranes (5) that are postulated to contain specialized membrane microdomains (8). Given the importance of Lck, the characterization of the cellular and molecular mechanisms that govern its transport to the plasma membrane is essential for understanding its function and dynamics. Although much is known about the biochemical regulation of Lck, very little is known about the protein machinery involved in the targeting of Lck to the T cell plasma membrane.

MAL is a 17-kD integral membrane protein containing a MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)

© 2008 Antón et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jem.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

O. Antón and A. Batista contributed equally to this paper.

domain present in proteins associated with membrane juxtaposition events (9) such as synaptophysins, synaptogyrins, and occludin (9). The MAL cDNA, which was initially characterized as being differentially expressed in Jurkat cells and other T cell lines, but not in B cell lines (10), is also expressed in polarized epithelial cells. MAL is selectively detected in detergent-resistant membrane fractions of epithelial cells, Jurkat cells, and PBLs (11, 12). Although the function of MAL in epithelial cells as an essential component of the machinery for specialized protein exocytosis to the apical surface is well established (12–14), its function in T cells has remained merely a matter of speculation (15).

In response to appropriate antigens presented by an APC, TCR-induced signals assemble a sophisticated apparatus for ongoing signaling (1) and induce T cells to polarize and form a surface subdomain at the T cell–APC contact zone, known as the immunological synapse (IS) (16). The formation of an IS is a dynamic process that involves polarization of TCR, Lck, and other signaling machinery, microtubule-organizing center (MTOC), integrin LFA-1, and actin cytoskeleton (16). The Jurkat T cell line and mutant derivatives have been important tools for investigating TCR-driven signaling and polarization (17). In this study, we have used MAL knockdown experiments involving short interfering RNA (siRNA) expression in Jurkat cells and primary T lymphocytes and a novel TCR signaling-defective Jurkat cell clone lacking MAL expression to investigate the role of MAL in T cells. Time-lapse videomicroscopy showed that Lck reaches the plasma membrane in transport carriers containing MAL. The formation of the carriers, as well as the partitioning of Lck into detergent-resistant membranes, was blocked in the absence of MAL expression, resulting in intracellular accumulation of Lck. The formation of transport carriers for Fyn or p75 was not affected under those conditions. Probably as a consequence of the depletion of Lck at the plasma membrane, polarized assembly of TCR and Lck to the IS and activation of the signaling pathways leading to IL-2 gene transcription were both impaired. Exogenous expression of MAL fully corrects all the functional defects observed in the absence of MAL expression including formation of Lck transport carriers, partitioning of Lck, and IL-2 promoter activation. Therefore, MAL, which was found to associate with Lck, has an essential role mediating the targeting of Lck to the T cell plasma membrane by allowing recruitment of Lck to specialized intracellular membrane microdomains and formation of specific transport carriers destined for the plasma membrane. This novel transport pathway is crucial for TCR-mediated signaling and IS formation.

RESULTS

Polarized targeting to the IS is deficient when MAL is not expressed

During a screening program involving the analysis of cDNA microarrays to identify novel Jurkat T cell mutants with defective TCR-induced signaling, a cell clone known as Jurkat TCR-signaling impaired mutant (JTIM) with no detectable MAL messenger RNA (mRNA) expression was isolated.

The procedure used was similar to that previously described for the generation and selection of mutants defective in PMA-induced CD69 up-regulation (18, 19). The reduced MAL mRNA expression in this clone was further confirmed by Northern blot and quantitative RT-PCR analyses (Fig. S1, A and B, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/>

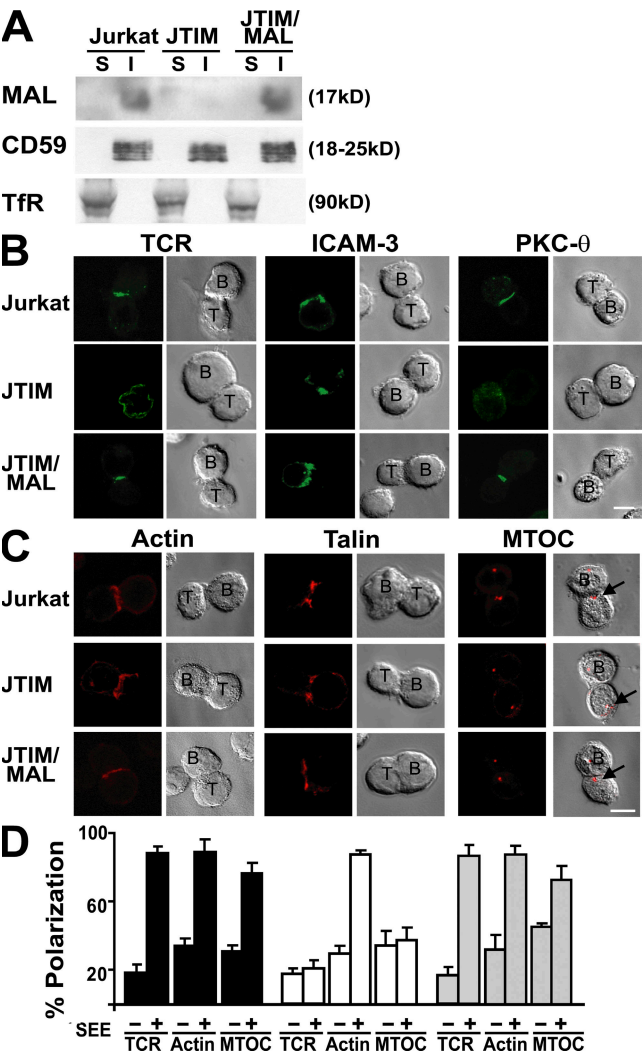


Figure 1. MAL expression is required for translocation of TCR and reorientation of MTOC to IS. (A) Normal Jurkat cells, JTIM cells, and JTIM/MAL cells were extracted with 1% Triton X-100 at 4°C. The soluble (S) and insoluble (I) fractions were isolated by centrifugation to equilibrium in sucrose density gradients. Equivalent aliquots from both fractions were analyzed by immunoblotting with anti-MAL mAb 6D9. The distributions of CD59 and Tfr, as respective markers of the insoluble and soluble fractions, were analyzed as a control of the fractionation procedure. (B and C) Cells were conjugated to SEE-pulsed APCs for 15 min. After cell fixation, the distribution of TCR, ICAM-3, and PKC-θ (B) and that of actin, talin, and γ-tubulin (C) were analyzed in nonpermeabilized or permeabilized cells, respectively. The arrows indicate the position of the MTOC in the T cell. (D) The mean percentage ± SEM of Jurkat cells in T cell–APC conjugates with polarized distribution of TCR, actin, and MTOC to the IS was quantified in three independent experiments. *n* > 100 T cells/experiment (right). Bars, 5 μm.

jem.20080552/DC1). Fig. 1 A confirms that JTIM cells do not express detectable levels of MAL, whereas the expression of MAL and its partition in detergent-insoluble membrane fractions were similar in normal Jurkat cells and JTIM cells in which MAL expression was reconstituted by stable transfection of MAL cDNA (JTIM/MAL cells). JTIM cells established T cell–APC conjugates either in the presence or absence of staphylococcal enterotoxin E (SEE) superantigen with the same efficiency as normal Jurkat cells (Fig. S1C), allowing investigation of the possible requirement of MAL for targeting of receptors, cytoskeleton, and signaling molecules to IS. JTIM cells were unable to translocate the TCR, PKC-

θ, and MTOC to the IS in response to stimulation, whereas ICAM-3, actin, and talin distributed to the IS normally (Fig. 1, B–D). In addition, JTIM cells failed to target ZAP-70 and LAT to the IS (Fig. S2). It is of particular note that stable exogenous expression of MAL in JTIM cells restored the IS polarization pattern observed in normal Jurkat cells (Fig. 1, B–D and Fig. S2).

To confirm that MAL is required for normal IS formation, we used an RNA interference knockdown approach. For this purpose, we expressed siRNAs (MAL siRNA1 and 2) targeted to a region adjacent to the AUG translation initiation site (MAL siRNA1) or to the 3′ untranslated region

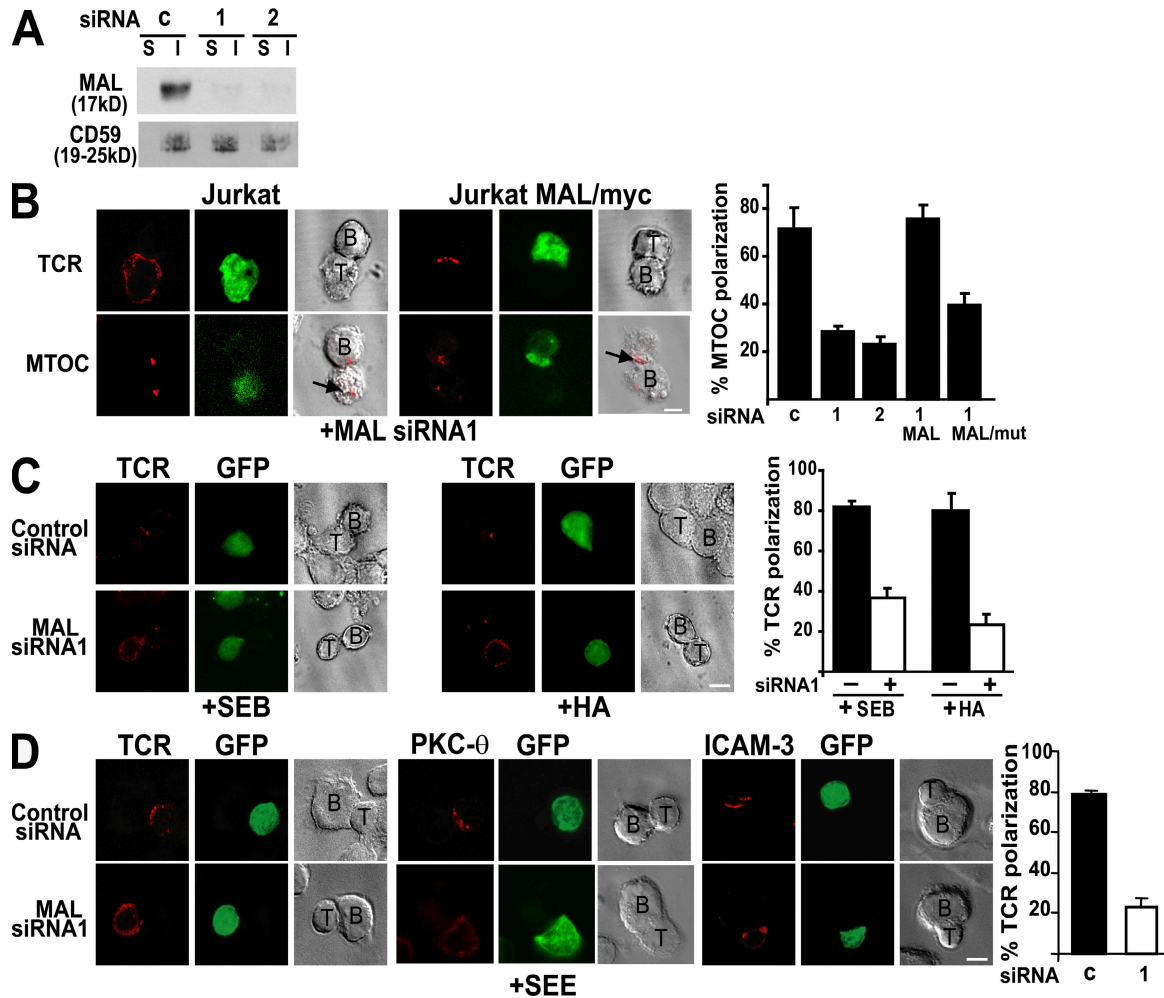


Figure 2. Effect of MAL knockdown on IS formation in Jurkat cells and primary T lymphocytes. (A) Jurkat cells were transfected with DNA constructs expressing GFP and a control (c) siRNA or the indicated MAL siRNA and incubated for 48 h at 37°C. GFP-expressing cells were separated in a cell sorter and analyzed for MAL expression by immunoblotting with anti-MAL mAb 6D9. (B) Normal Jurkat cells or Jurkat cells stably expressing either MAL/myc or MALmut/myc were transfected with pMAL-siRNA1/GFP or pMAL-siRNA2/GFP, as indicated. After 48 h at 37°C, cells were conjugated to SEE-loaded Raji cells for 20 min and fixed. The distribution of TCR and MTOC was determined by immunofluorescence analysis. The arrows indicate the position of the MTOC in the T cell. A quantitative analysis of the effect of MAL siRNA expression on MTOC reorientation is shown in the histogram. (C) Jurkat CH7C17 cells expressing GFP and a control siRNA or MAL siRNA1 for 48 h at 37°C were conjugated to either SEB or HA peptide-loaded HOM2 cells for 20 min and fixed. The distribution of TCR was determined by immunofluorescence analysis. (D) Human PBLs were transfected with plasmid DNA expressing GFP and a control siRNA or MAL siRNA1 and incubated for 36 h at 37°C. Cells were then conjugated to SEE-loaded APCs for 15 min. After cell fixation, the distribution of TCR, PKC-θ, and ICAM-3 was determined by immunofluorescence analysis. The histograms show the mean ± SEM of the percentage of APC-conjugated GFP-expressing T cells with MTOC (B) or TCR (C and D) polarized to the IS. Three independent experiments were performed. *n* > 100 T cells/experiment. Bars, 5 μm.

(MAL siRNA2) of endogenous human MAL mRNA. To identify the transfected cell population, GFP was expressed from the same DNA constructs. Expression of MAL siRNA1 and 2 was able to reduce endogenous MAL levels of Jurkat cells to <10% of the MAL content in cells expressing a control siRNA (Fig. 2 A). MAL knockdown in Jurkat cells recapitulated the IS targeting defects observed in JTIM cells for TCR and MTOC (Fig. 2 B), as well as for PKC- θ (not depicted). To rule out possible spurious effects of the siRNA, we used a stable clone of Jurkat cells (Jurkat MAL/myc cells) expressing MAL, tagged at its amino terminus with the Myc epitope encoded by a recombinant mRNA that does not fully pair with MAL siRNA1 (12). The expression of MAL siRNA1 in these cells had no effect on the polarization of TCR and MTOC to the IS because the exogenous protein was able to substitute the endogenous protein (Fig. 2 B). As a further control we observed that the expression of a similar MAL protein (MALmut/myc) with a modified sequence at its carboxyl terminus (RWKSS→RWSSS), which is known to be inactive in polarized apical transport (20), was unable to replace endogenous MAL (Fig. 2 B, histogram).

It is apparent that the effect of MAL depletion on IS targeting was not restricted to the use of the superantigen SEE, given that similar results were observed in T cell–APC conjugates formed with Jurkat CH7C17 cells (21) in the presence of staphylococcal enterotoxin B or the influenza HA peptide 307–319 (Fig. 2 C). Similar to the case of MAL-deficient Jurkat cells, expression of MAL siRNA in primary T lymphocytes resulted in an impaired translocation of TCR and PKC- θ , but not of ICAM-3, to the IS (Fig. 2 D). Thus, using Jurkat cells and primary T lymphocytes, we observed that normal IS formation is strictly dependent on MAL expression.

MAL is required for the targeting of Lck to the plasma membrane

In an attempt to identify proteins whose surface expression might be affected in JTIM cells, we analyzed the plasma membrane distribution of TCR, ICAM-3, LAT, CD4, CD28, LFA-1, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (CD59 and CD55), and Lck at steady state. Among the molecules examined, there were proteins mostly detected in detergent-insoluble membranes of resting T cells (LAT, CD59, CD55, and Lck) or predominantly excluded from these membrane fractions (TCR, ICAM-3, CD4, CD28, and LFA-1). Only in the case of Lck did we observe striking differences in distribution between MAL-deficient and MAL-expressing Jurkat cells. Thus, although Lck was distributed at the cell periphery and in internal endosome structures in WT Jurkat and JTIM/MAL cells, it was present only at very low levels at the plasma membrane and was largely concentrated in a compact intracellular structure in most JTIM cells (Fig. 3 A). Consistent with the intracellular accumulation observed in JTIM cells, MAL siRNA expression diminished the expression of Lck at the cell periphery and led to its intracellular accumulation also in primary T lymphocytes (Fig. 3 B). It is of particular note that the loss of peripheral Lck in JTIM cells was associated

with the predominant exclusion of Lck from detergent-insoluble membranes (Fig. 3 C). This implies that MAL expression in Jurkat cells is necessary for both efficient Lck targeting to the plasma membrane and normal partitioning into detergent-insoluble membrane fractions. Neither the partitioning of LAT (Fig. 3 C) and CD59 (Fig. 1 A) nor their targeting at the cell surface was affected by the absence of MAL (Fig. S2 and not depicted). Pulse-chase experiments revealed that although Lck was already associated with membranes in normal and JTIM cells 15 min after its biosynthesis, incorporation of Lck into detergent-insoluble membranes was only observed in normal cells (Fig. S3). As occurred with the TCR, Lck did not redistribute to the IS in T cell–APC conjugates formed using JTIM cells (Fig. 3 D). The observation that the levels of Lck into detergent-insoluble membranes strictly correlated with MAL expression prompted us to analyze whether MAL associates with Lck. Coimmunoprecipitation experiments using Jurkat MAL/myc cells indicated association of MAL with endogenous Lck (Fig. 3 E, left). This association was also detected in COS-7 cells transiently expressing both proteins (Fig. 3 E, right). The interaction was mapped to the amino terminus of Lck, as demonstrated by coimmunoprecipitation of MAL with a chimera consisting of the membrane proximal 10-aa sequence of Lck fused to GFP (Lck₁₀-GFP). As controls, we observed that neither the p75-GFP chimera nor GFP coimmunoprecipitated with MAL (Fig. 3 E, right).

To address whether impaired IS assembly in JTIM cells was caused by the low levels of Lck at the cell periphery, JTIM cells were forced to express Lck at the plasma membrane by transfecting DNA constructs encoding CD4/Lck or LAT/Lck chimeras, consisting of the extracellular and transmembrane domains of mouse CD4 or human LAT, respectively, fused to the amino terminus of Lck. The use of the CD4 and LAT transmembrane domains, which are predominantly excluded from or associated with detergent-insoluble membranes, respectively, allowed us to investigate whether the partitioning of Lck in this type of membrane influences IS formation in the absence of MAL expression. Fig. 4 (A–C) shows that the expression of either chimera in JTIM cells bypassed the requirement of MAL for targeting TCR, ZAP-70, and PKC- θ , but not the MTOC, to the IS. Furthermore, the chimeras were unable to rescue Erk activation (Fig. 4 D), which was deficient in JTIM cells, and CD69 up-regulation (Fig. 4 E), which is regulated by transcription factor AP-1, in response to stimulation.

In summary, these data show that MAL regulates the targeting of Lck to the plasma membrane, probably by allowing its inclusion in specialized membrane microdomains and that, although the absence of Lck at the plasma membrane is likely to be a major cause of the defects observed in MAL-depleted cells, it is not the sole cause because forced expression of Lck to the plasma membrane was not able to restore all the defects.

MAL is necessary for the formation of vesicular carriers that transport Lck to the plasma membrane

The requirement of MAL for Lck targeting to the T cell surface prompted us to compare the distribution of these two

molecules in Jurkat cells. As our anti-MAL mAb is not of use in immunofluorescence analysis, we used Jurkat cells stably expressing GFP-MAL. Confocal microscopic analysis shows that MAL and Lck colocalized extensively at these two locations (Fig. 5 A). Next, we studied the dynamics to investigate the possible involvement of MAL in Lck transport using a Lck-GFP chimera. As a control, we observed that transiently expressed Lck-GFP accumulated intracellularly in JTIM cells even more drastically than endogenous Lck, whereas Lck-GFP was able to reach the plasma membrane efficiently in

normal Jurkat and JTIM/MAL cells (Fig. 5 B). To trace the formation and movement of Lck transport vesicles from the perinuclear region to the cell surface in living cells and to compare Lck dynamics with those of MAL, we transiently expressed Lck-Cherry in Jurkat cells stably expressing GFP-MAL. The presence of the fluorescent protein moiety in MAL and Lck did not affect either their partitioning into detergent-insoluble membranes or their subcellular distribution (unpublished data). Time-lapse experiments showed that MAL and Lck travel in the same transport carriers destined for the

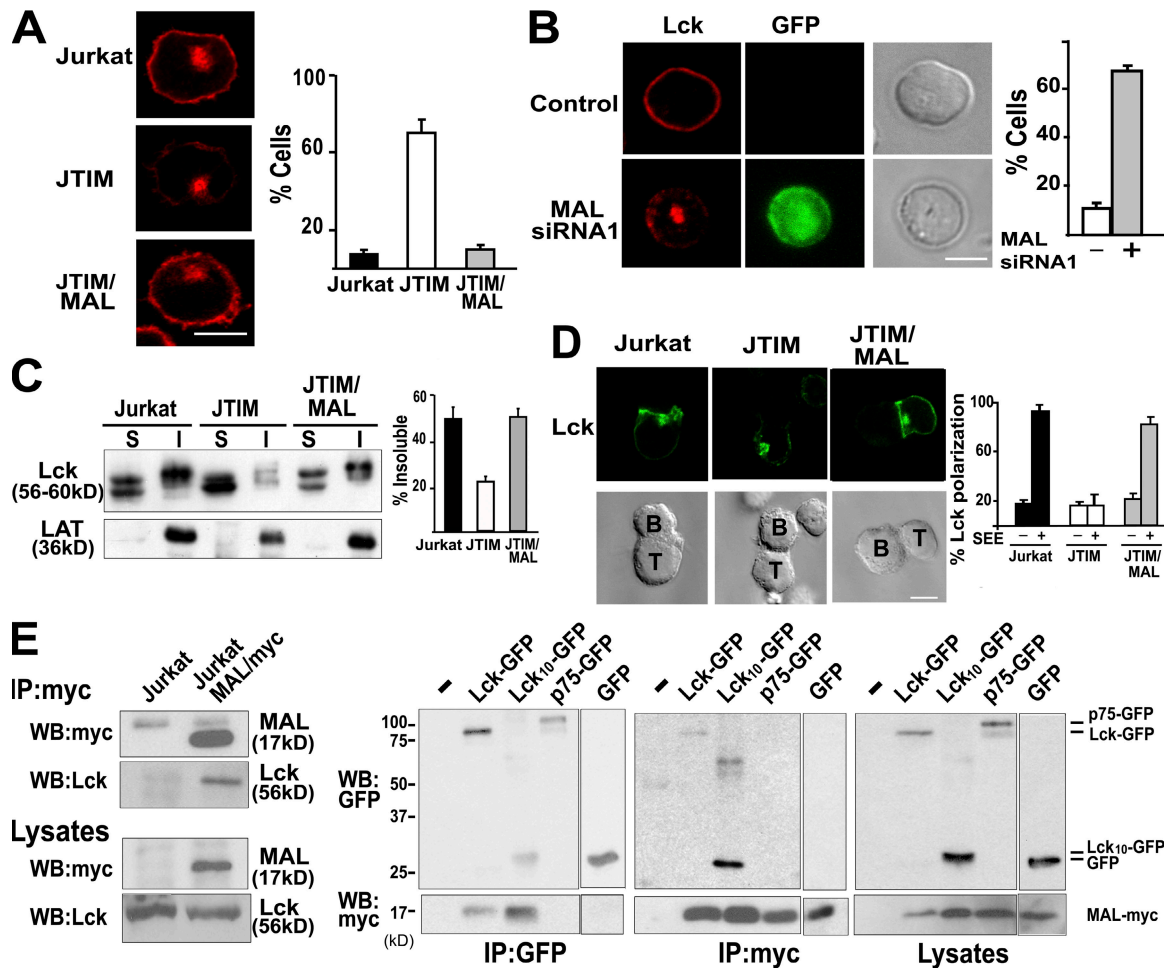


Figure 3. MAL is required for the targeting of Lck to the plasma membrane. (A) The subcellular distribution of endogenous Lck was analyzed by indirect immunofluorescence in the three types of Jurkat cell. The percentage of cells with low levels of peripheral Lck are shown on the right and measured as described in Materials and methods. (B) Human PBLs were transfected with plasmid DNA expressing GFP and MAL siRNA1 and incubated for 36 h at 37°C. After cell fixation, the distribution of Lck was determined by immunofluorescence analysis in three independent experiments. $n > 100$ T cells/experiment. The histograms represent the mean percentage \pm SEM of cells with predominant intracellular localization of Lck. (C) The soluble (S) and insoluble (I) membrane fractions of resting normal Jurkat cells, JTIM cells, and JTIM/MAL cells were isolated by centrifugation to equilibrium. Equivalent aliquots from both fractions were then analyzed by immunoblotting to detect endogenous Lck and LAT. The histogram represents the mean percentage \pm SEM of Lck into the membrane insoluble fraction. Three independent experiments were performed. (D) Cells were conjugated to SEE-pulsed APCs for 15 min. After cell fixation, the distribution of Lck was analyzed. The histogram represents the mean percentage of Jurkat cells in T cell-APC conjugates with polarized distribution of Lck to the IS as quantified in three independent experiments. $n > 100$ T cells/experiment. (E) Lysates of normal Jurkat cells or Jurkat cells stably expressing MAL/myc cells were immunoprecipitated with anti-myc mAb, and the immunoprecipitates and the original lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies to the c-myc tag or to Lck as indicated (left). Normal COS-7 cells or COS-7 cells transiently coexpressing MAL/myc and Lck-GFP, Lck₁₀-GFP, p75-GFP, or GFP were lysed and immunoprecipitated with anti-myc or GFP antibodies. The immunoprecipitates and the original lysates were finally analyzed by immunoblot with anti-myc and anti-GFP antibodies as indicated (right). Bars, 5 μ m.

plasma membrane (Fig. 5 C and Video 1, available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20080552/DC1>). The colocalization plot of MAL and Lck shows a high level of colocalization between both proteins throughout the time-lapse experiment. The Pearson's correlation coefficient and the overlap coefficient according to Manders (22) were 0.945 and 0.954, respectively.

To examine the requirement of MAL for the formation of the Lck transport vesicles, we compared the dynamics of Lck at the perinuclear accumulation in the three types of Jurkat cell. Fig. 6 A and Videos 2–4 (available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20080552/DC1>) show that although formation of Lck exocytic vesicles occurred in MAL-expressing cells, this process was almost completely blocked in JTIM cells. Only a very small number of much smaller vesicles were sporadically detected in JTIM cells. As a control, we observed that JTIM cells, although unable to transport Lck to the plasma membrane, were active in the formation of transport vesicles containing the transmembrane protein p75 or the tyrosine kinase Fyn (Fig. 6 B and Videos 5 and 6). Consistent with these observations, unlike MAL and Lck, which colocalized extensively, Fyn and p75 showed a much

Downloaded from jem.rupress.org on December 30, 2008

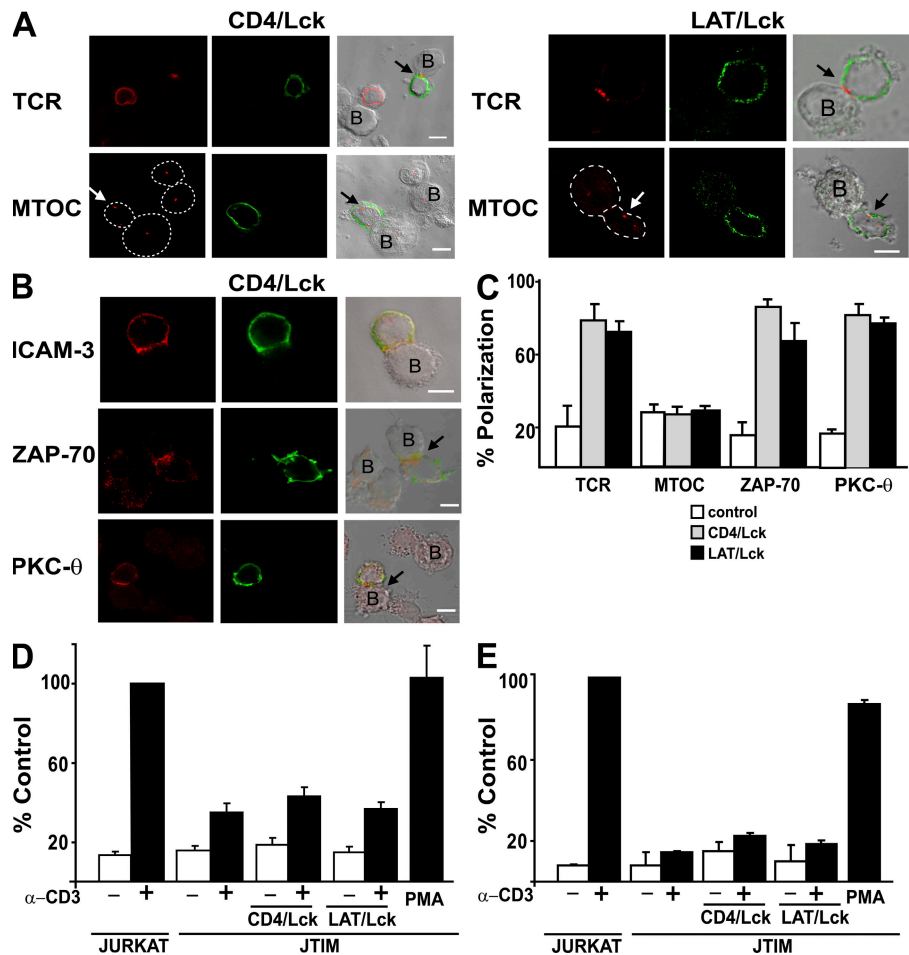


Figure 4. Forced expression of Lck at the plasma membrane in MAL-deficient cells corrects TCR targeting to the IS. JTIM cells were transfected with the CD4/Lck or the LAT/Lck plasmids. After 48 h at 37°C, cells were conjugated to SEE-loaded Raji cells for 20 min and fixed. Transfected cells were detected with antibodies to mouse CD4 or to the c-Myc tag to detect expression of the CD4/Lck or LAT/Lck chimeras, respectively. (A) The distribution of TCR and MTOC was determined by immunofluorescence analysis. In the case of MTOC analysis, the contour of the cells has been drawn with a dotted line to facilitate the identification of the cells. The arrows indicate the position of the TCR or MTOC in the T cells expressing the chimera. (B) The distribution of ICAM-3, ZAP-70, and PKC-θ was determined by immunofluorescence analysis. Conjugates in A and B formed by untransfected JTIM cells serve as internal controls. Bars, 5 μm. (C) Quantitative analysis of the polarization of TCR, MTOC, ZAP-70, and PKC-θ in JTIM cells expressing the CD4/Lck or LAT/Lck chimeras. Three independent experiments were performed. $n > 100$ T cells/experiment. The histogram shows the mean percentage \pm SEM of APC conjugates with TCR, MTOC, ZAP-70, or PKC-θ polarized to the IS. (D and E) Jurkat cells and JTIM cells transfected or not with the CD4/Lck or LAT/Lck chimeras were transfected with CD4ΔCyt-GFP (D) or pEGFP-C1 (E) and treated with activating anti-CD3 antibodies or PMA as indicated. After 15 min (D) or 16 h (E) at 37°C, EGFP-expressing cells were analyzed for phosphorylated Erk (D) or CD69 (E) expression by flow cytometry. The cotransfection efficiency was $>80\%$ as determined by immunofluorescence microscopy. The histograms show the percentage \pm SEM of the mean fluorescence of phospho-Erk and CD69 obtained in each case relative to that of Jurkat cells stimulated with anti-CD3 antibodies. Three independent experiments were performed.

lower colocalization with MAL (Fig. 6 C). The Pearson's correlation coefficient and the overlap coefficient according to Manders were 0.710 and 0.740, respectively, for MAL/

p75 and 0.752 and 0.546 for MAL/Fyn. We conclude from this set of experiments that MAL colocalizes extensively with Lck at steady state, is present in the same transport carriers that contain Lck, and is essential for the formation of such specific carriers.

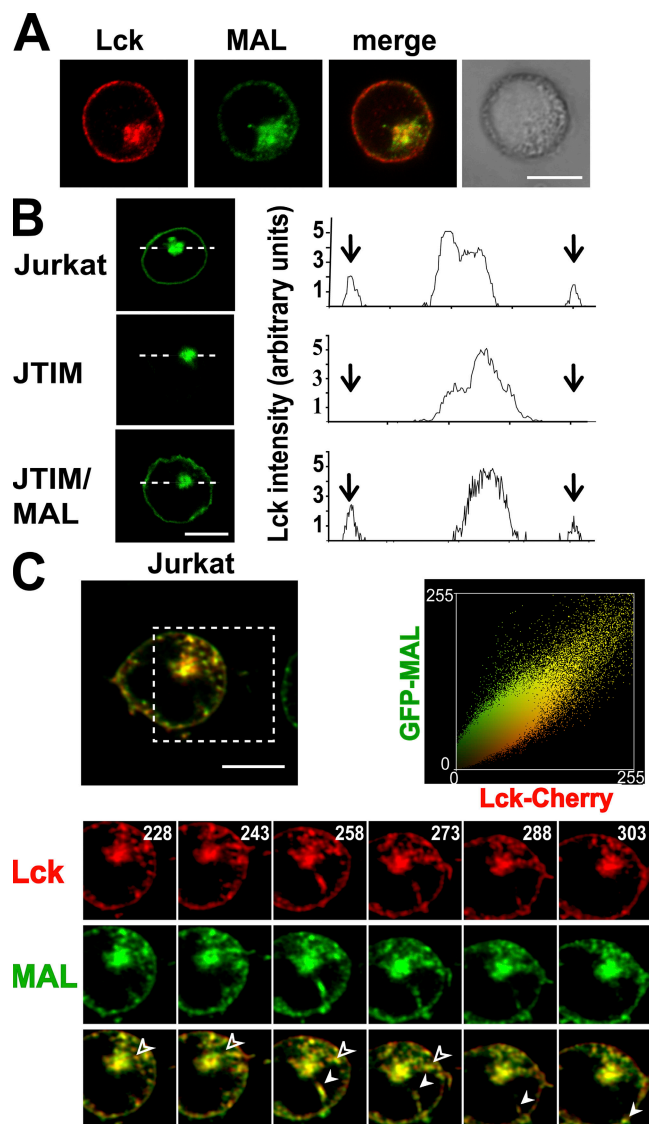


Figure 5. Lck and MAL travel in the same transport vesicles destined for the plasma membrane. (A) Jurkat cells stably expressing GFP-MAL were subjected to double label immunofluorescence analysis to detect GFP-MAL and endogenous Lck. (B) Cells were transfected with Lck-GFP and the distribution of Lck-GFP was analyzed 20 h later. A densitometric analysis of the distribution of Lck-GFP along the line in each type of cell is shown on the right panels. Arrows indicate the position of the periphery of the cell. (C) Jurkat cells stably expressing GFP-MAL were transiently transfected with plasmid DNA expressing Lck-Cherry and subjected to time-lapse videomicroscopy. The processes occurring within the region indicated by the dashed square are shown at higher magnification in the bottom panels. Solid and empty arrowheads indicate two vesicles transporting MAL and Lck together to the plasma membrane. Numbers indicate time in seconds. The plot on the right shows a high correlation of the colocalization of MAL and Lck throughout the time-lapse experiment (Pearson's correlation coefficient = 0.945).

MAL is essential for activation-induced AP-1, NF- κ B, and NFAT activities and for tyrosine phosphorylation in Jurkat cells

Because the JTIM cell clone was isolated as defective in TCR-mediated signaling, we investigated whether exogenous expression of MAL rescued the signaling defect by analyzing the effect of MAL expression in various signaling cascades induced by TCR stimulation. We first compared the activation of the mitogen-activated protein kinase Erk, p38, and JNK pathways, which lead to increased AP-1 activity, in the three Jurkat cell systems used that were stimulated with SEE (Fig. 7 A, left). Erk activation was detected in normal Jurkat cells but not in JTIM cells. Reconstitution of MAL in JTIM cells rescued Erk activation. In contrast to Erk, activation of p38 and JNK kinases was less affected in JTIM cells. Because AP-1 activity is regulated by Erk, JTIM cells were, as expected, deficient in their ability to stimulate AP-1 activity (Fig. 7 A, right). The activation state of the NF- κ B pathway was examined by analyzing the phosphorylation of the IKK- α/β subunits of IKK, a hallmark of the NF- κ B activation pathway (Fig. 7 B, left). Similar to the case of Erk, JTIM cells were unable to induce IKK- α/β phosphorylation, whereas normal phosphorylation occurred in JTIM/MAL cells. The impairment of IKK- α/β phosphorylation in JTIM, but not in WT Jurkat or MAL-expressing JTIM cells, was associated with the inhibition of NF- κ B activity (Fig. 7 B, right). The functionality of the NFAT activation pathway was addressed by analyzing the dephosphorylation of NFAT, which is a step required for NFAT activation (Fig. 7 C, left). This process was equally functional in normal Jurkat cells and JTIM/MAL cells even though it did not occur in JTIM cells. Consistent with this result, induction of NFAT transcriptional activity was impaired in JTIM cells compared with observations in the two types of MAL-expressing Jurkat cell (Fig. 7 C, right). Finally, we noticed that tyrosine phosphorylation of CD3 ζ , ZAP-70, and PLC- γ 1 in response to stimulation was defective in the absence of MAL but normal in the two types of MAL-expressing Jurkat cell, even though the three types of Jurkat cell that we used expressed similar levels of the three proteins (Fig. 7 D).

Next, we analyzed whether, in addition to restoring AP-1, NF- κ B, and NFAT responses to stimulation, exogenous MAL expression in JTIM cells was able to do the same with the transcriptional activation of the IL-2 promoter. Fig. 7 E shows that JTIM/MAL cells responded to SEE stimulation by activating IL-2 promoter-driven transcription at levels similar to those of normal Jurkat cells, whereas JTIM cells were basically unresponsive. As a control, we observed that all three cells were able to respond to stimulation with PMA plus ionomycin, indicating that this treatment bypasses the

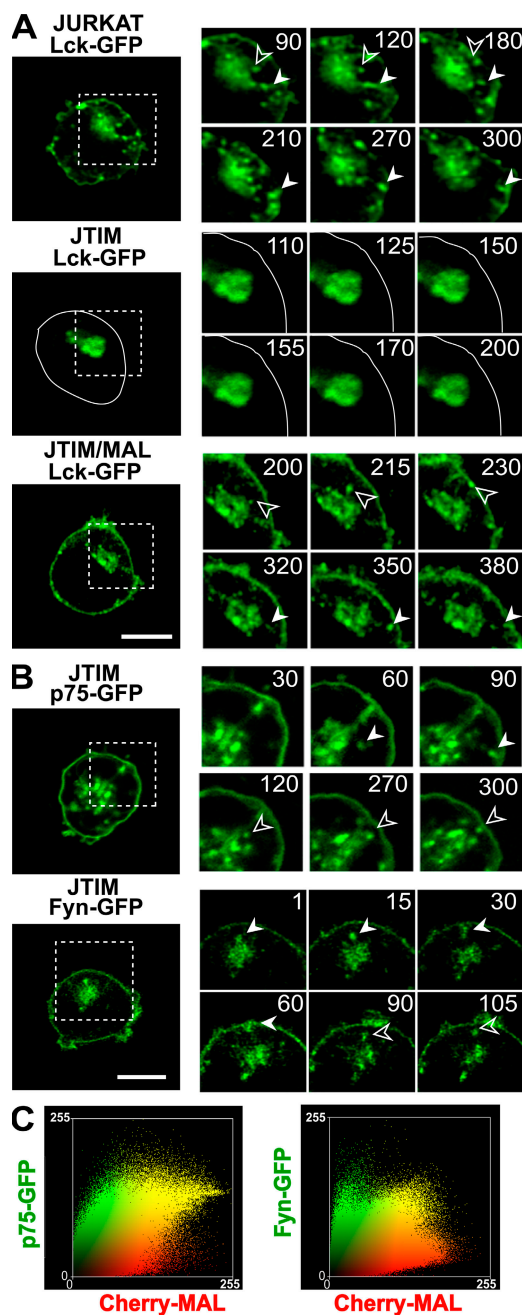


Figure 6. MAL is required for formation of vesicles transporting Lck to the plasma membrane. (A) WT Jurkat cells, JTIM cells, or JTIM/MAL cells were transiently transfected with plasmid DNA expressing Lck-GFP and monitored by time-lapse videomicroscopy to detect the formation of Lck-containing transport vesicles. The contour of the JTIM cell transfected with Lck-GFP has been drawn with a continuous line to indicate the position of the plasma membrane. (B) A similar analysis was done in JTIM cells transiently expressing p75-GFP and Fyn-GFP. The processes occurring within the regions indicated by the dashed squares are shown at higher magnification on the right. Filled and empty arrowheads indicate vesicles transporting Lck, p75, or Fyn. Numbers indicate time in seconds. Bars, 5 μ m. (C) Jurkat cells stably expressing Cherry-MAL were transiently transfected with plasmid DNA expressing p75-GFP or Fyn-GFP and subjected to time-lapse videomicroscopy. Colocalization plots of MAL

MAL defect in JTIM cells. Collectively, the results in Fig. 7 show that the sole expression of MAL in JTIM cells is sufficient to restore the signaling pathways controlling transcriptional activation of the IL-2 promoter.

DISCUSSION

The use of siRNA silencing techniques both in Jurkat and primary T cells and the isolation of a Jurkat cell variant lacking MAL expression allowed us to address the role and mechanism of action of MAL in T cells. Conjugates with APC were efficiently formed using MAL-depleted T cells, but TCR, Lck, ZAP-70, and PKC- θ did not redistribute to the IS. The requirement for MAL for IS formation was confirmed in T cell-APC conjugates formed in the presence of the SEB superantigen or a specific HA peptide. In addition to deficient IS formation, MAL-depleted cells were unable to activate signaling pathways leading to up-regulation of IL-2 promoter transcription in response to SEE and showed reduced levels of Lck at the cell periphery. All these defects were corrected by exogenous expression of MAL. Therefore, our results establish the requirement for MAL in the processes of IS formation and T cell activation.

Given the crucial role of MAL as an element of the specialized machinery for apical transport in epithelial cells (12–14, 23), an obvious aspect of interest concerning MAL function in T cells was its involvement in specialized membrane trafficking to the cell surface (15, 24). During our search for abnormally distributed plasma membrane proteins in MAL-deficient cells, we found that although Lck was distributed at both the cell periphery and in endosomes in normal Jurkat cells, Lck was practically absent from the plasma membrane and instead was concentrated in a compact intracellular structure in Jurkat cells lacking MAL expression. It is of particular note that Lck distributed normally when MAL levels were reconstituted by exogenous expression. Consistent with these findings, knockdown of MAL levels in primary T cells reduced the presence of Lck at the plasma membrane with concomitant intracellular accumulation compared with the exclusive peripheral expression of Lck in control cells. Therefore, MAL appears to be crucial for normal targeting of Lck to the T cell surface.

Lck is known to rely on membrane-trafficking mechanisms for targeting to the cell surface (6). Expression of Lck at the plasma membrane is essential for T cell function because Lck mutants that are unable to reach the plasma membrane are defective in T cell signaling (7). The presence of a pool of Lck in endosome structures and their colocalization with MAL in normal Jurkat cells are consistent with a possible role for MAL in Lck exocytosis. This view was supported by our observations of time-lapse videomicroscopy in living cells, in which Lck and MAL traveled in the same vesicles

and p75 or Fyn throughout the time-lapse experiment are shown. Pearson's correlation coefficients were 0.710 and 0.752 for MAL/p75 and MAL/Fyn, respectively.

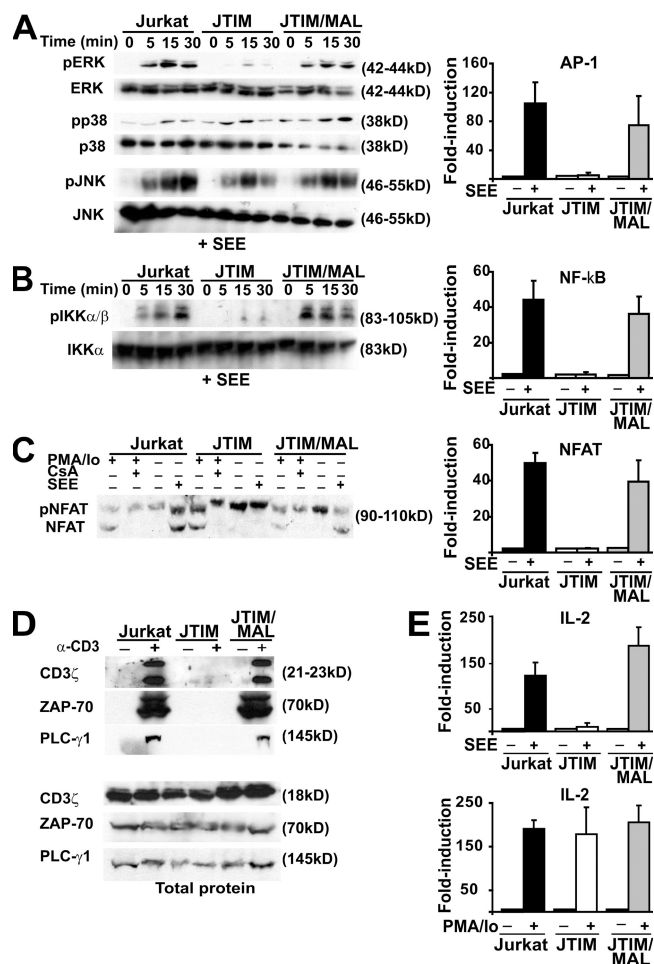


Figure 7. Signaling pathways of Jurkat cells leading to activation of AP-1, NF-κB, and NFAT and to induced tyrosine phosphorylation are dependent on MAL expression. (A) The three types of Jurkat cell were conjugated to APCs pulsed with SEE for the indicated times. Cell extracts were analyzed by immunoblotting to detect the activated, phosphorylated (p) forms or the total content of Erk, p38, and JNK as indicated (left). Cells were transfected with a luciferase reporter plasmid whose transcription was controlled by AP-1. Cells were then conjugated to APCs, which were pulsed or not with SEE. After 4 h, luciferase activity was measured (right). (B) The three types of Jurkat cell were conjugated for the indicated times to APCs pulsed with SEE. Cell extracts were analyzed by immunoblotting to detect the activated phosphorylated forms of IKK-α/β or the total content of IKK-α (left). Cells were transfected with a luciferase reporter plasmid whose transcription was controlled by NF-κB. Cells were then conjugated to APCs, which were pulsed or not with SEE. After 4 h, luciferase activity was measured (right). (C) Cells were conjugated to APCs pulsed with SEE for 1 h at 37°C. Cell extracts were analyzed by immunoblotting with anti-NFAT antibodies that detect both the inactive phosphorylated NFAT and the active dephosphorylated NFAT forms. Control of cells treated for 1 h with PMA plus ionomycin (Io) in the absence or presence of cyclosporin A (CsA) was included to help identification of phosphorylated and dephosphorylated NFAT (left). The three types of Jurkat cell were transfected with a luciferase reporter plasmid whose transcription was controlled by NFAT. Cells were then conjugated to APCs, which were pulsed or not with SEE. After 4 h, luciferase activity was measured (right). (D) Cells were treated or not with activating anti-CD3 UCHT1 antibodies for 15 min. Cell extracts were immunoprecipitated with

destined for the cell surface. The vesicles were large and formed discontinuously. It is worth noting that the formation of the vesicles containing Lck was impaired in the MAL-deficient Jurkat variant, and only a few much smaller vesicles were sporadically formed. The absence of MAL did not provoke a general block on the generation of transport vesicles because vesicles containing Fyn-GFP or p75-GFP formed efficiently in JTIM cells. Our results indicate that MAL mediates a specialized route of transport in T cells that is used for targeting Lck to the plasma membrane.

Membrane microdomains were originally postulated as being specialized platforms for apical transport (8). Although controversial (25), it is sometimes assumed that the membrane fraction resistant to detergent solubilization is enriched in membrane microdomains (26, 27). Approximately 30–50% of Lck is isolated in detergent-insoluble membrane fractions (28, 29). Consistent with the observed colocalization of MAL and Lck in endosome structures in Jurkat cells, both proteins cofractionate in a detergent-insoluble subendosomal membrane fraction (11). It is of particular note that the inability of Lck to reach the plasma membrane in MAL-deficient Jurkat cells is associated with its exclusion from detergent-insoluble membrane fractions. Similar to the strict link between plasma membrane targeting and detergent insolubility for Lck found in WT, MAL-deficient, and MAL-reconstituted Jurkat cells, polarized apical targeting of HA in Mardin-Darby canine kidney cells is associated with HA insolubility in a MAL expression-dependent manner (12). This latter observation, together with the association found between MAL and HA, was interpreted as meaning that one of MAL's functions is to recruit HA to membrane platforms for apical exocytosis (12, 20). Consistent with this view, the transport defect observed for Lck in the absence of MAL expression may be explained by a membrane alteration that prevents incorporation of Lck into specific membrane platforms acting in Lck exocytosis. Because MAL associates with Lck and exogenous expression of MAL fully restored not only the blocking of the partitioning into detergent-insoluble membranes but also the transport of Lck, it might be that a primary function of MAL in T cells is to recruit Lck to specialized membranes involved in the formation of transport carriers and the subsequent targeting of Lck to the plasma membrane.

In addition to the redistribution of receptors and signaling machinery, IS formation implies recruitment of actin

antiphosphotyrosine PY20 mAb coupled to agarose. The phosphotyrosine immunoprecipitates were immunoblotted to detect tyrosine phosphorylated CD3ζ, ZAP-70, and PLC-γ1 (top). The original extracts were immunoblotted to show the total content of CD3ζ, ZAP-70, and PLC-γ1 (bottom). (E) The three types of Jurkat cell were transiently transfected with plasmid DNA containing the luciferase gene under the control of the IL-2 promoter. After 16 h, cells were conjugated to APCs, which were pulsed or not with SEE (top), or incubated or not with PMA plus ionomycin (Io; bottom). After 4 h, cell extracts were used to determine luciferase activity. Data are represented as mean ± SEM of the luciferase activity in stimulated cells relative to that in unstimulated cells.

cytoskeleton elements, which form a specialized network of actin filaments while retaining their apparently normal subcortical organization in the rest of the cell membrane, and repositioning of MTOC, which controls the position of the secretory and endocytic compartments toward the IS (30). Repositioning of these compartments could have consequences on the activation process that could bring Fyn, Pyk2, and other signaling molecules closer to IS (31). It has also been reported that a pool of Lck and LAT that is associated with recycling endosomes translocates to mature synapses (32, 33). Therefore, the absence of MTOC reorientation in MAL-deficient cells probably affects polarized targeting from the secretory/endocytic compartments to IS (32–34).

Both actin and talin redistributed to the IS regardless of whether MAL was expressed, implying that MAL is not required for this process. Remarkably, unlike the TCR, which required MAL for IS targeting, ICAM-3 was normally recruited in the absence of MAL. This indicates that ICAM-3 targeting to IS takes place by MAL-independent mechanisms that are most probably linked to the actin cytoskeleton rearrangement. In this regard, association of ICAM-3 with ERM proteins has been previously documented (35). In contrast to the remodeling of the actin cytoskeleton, the MTOC did not reorient to the IS in the absence of MAL. MTOC reorientation is impaired in Lck- or ZAP-70-deficient Jurkat cells (36) and requires phosphorylation in tyrosine of immunoreceptor tyrosine-based activation motifs that are present at the cytoplasmic tail of the CD3 subunits (37). To analyze whether the absence of Lck at the plasma membrane can by itself fully account for the failure to trigger the signals required for proper IS formation, we forced the expression of Lck at the plasma membrane by expression of CD4/Lck and LAT/Lck transmembrane chimeras in JTIM cells. It is of particular note that the chimeras were able to restore the targeting of TCR, ZAP-70, and PKC- θ to IS, indicating that these transmembrane forms of Lck, regardless of their level of partitioning into detergent-insoluble membranes, were equally able to initiate TCR-induced signaling even in the absence of MAL expression. Despite this, however, both chimeras did not correct MTOC reorientation or TCR-induced downstream signaling events such as ERK activation and CD69 up-regulation. These findings indicate that the deficient targeting of Lck to the plasma membrane is not the sole cause of the effects observed in MAL-deficient cells and implies that, in addition to transporting Lck, MAL mediates other functions in the cell, probably related to the transport of other specific molecules and the repositioning of the MTOC.

Jurkat cells lacking MAL expression were unable to activate transcription of the IL-2 promoter in response to stimulation with SEE. Consistent with this observation, the signaling pathways leading to activation of transcription factors AP-1, NF- κ B, and NFAT, or to increased tyrosine phosphorylation of specific substrates, were defective. Reconstitution of MAL levels by exogenous expression made these pathways fully operative and rescued normal response of the IL-2 promoter to T cell stimulation. Restoration of these pathways is proba-

bly mediated by correction of the abnormal targeting of Lck, and probably of other signaling molecules, that is observed in the absence of MAL expression.

A constitutive MAL KO mouse line was generated to investigate the role of MAL on myelin formation (38). The mice were viable, had a normal life span, and appeared grossly normal. However, a closer inspection revealed defects in axon–glia interactions. Importantly, although MAL is expressed in oligodendrocytes and Schwann cells, alterations were observed only in the central nervous system, whereas the peripheral nervous system did not seem to be affected. The possible existence of a compensatory mechanism of another as yet unknown MAL family protein was claimed that might replace the functional role of endogenous MAL at the peripheral nervous system. Unlike humans, thymus, primary T cells, and T cell lines of mouse origin do not express the MAL gene. The most plausible explanation is that another member of the MAL protein family or of the MARVEL domain-containing protein superfamily does the job in mouse T cells. This reminds us of the caution that must be exercised in making definitive assignments of physiological function across species. Although animal models are undoubtedly quite useful for biomedical research, it is clear that studies in human cells need to be performed to learn about human cell functioning.

Progress in understanding MAL function as a component of the machinery for specialized routes of protein transport was first made possible in epithelial cells by taking advantage of the seminal discoveries made in epithelial cells concerning protein sorting (39). In this study, using gene silencing in Jurkat T cells and primary human T lymphocytes, and a Jurkat cell clone with deficient MAL expression, we have found an essential role for MAL in exocytic transport of Lck to the plasma membrane. In addition, our results highlight the similarity of the Lck transport process of T cells to that of the specialized MAL-mediated apical route of protein exocytosis of polarized epithelial cells. Normal functioning of this novel transport pathway is essential for T cell activation and IS formation.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Rabbit antibodies to CD3 ζ and ZAP-70, and mAb UCHT-1 (IgG1) and APA 1.1 to CD3 (used for cell activation and immunoblot analysis, respectively), were provided by A. Alarcón (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, Spain). Rabbit polyclonal antibody to Lck (used for immunofluorescence analysis) was provided by A. Veillette (McGill University, Montreal, Canada). Mouse mAb MEM-43/5 to CD59 was a gift from V. Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic); mAbs to PLC- γ 1 and PKC- θ and the antiphosphotyrosine PY20 antibodies, coupled or not to agarose, were obtained from BD; mouse hybridomas producing anti-CD3 ϵ mAb OKT3 and anti-Myc mAb 9E10 were purchased from the American Type Culture Collection; and antibodies to LAT were obtained from Millipore. Antibodies to total or phosphorylated Erk and p38 used for immunoblotting were obtained from Promega and Santa Cruz Biotechnology, Inc., respectively. The anti-JNK and anti- $\text{IKK-}\alpha/\beta$ antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. The antibodies to NFAT, ICAM-3, and mouse CD4 were provided by J.M. Redondo (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, Spain), F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, Spain), and J.M. Rojo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain), respectively. Antibodies to γ -tubulin, talin, and GFP were obtained from Sigma-Aldrich. We

obtained SEE and SEB from Toxin Technology, Inc. HRP-conjugated antibodies were obtained from Thermo Fisher Scientific. Fluorochrome-labeled secondary goat antibodies, fluorescent phalloidin, and the fluorescent cell tracker chloromethyl derivative of aminocoumarin (CMAC) were purchased from Invitrogen.

Cell culture conditions and conjugate formation procedure. Human T lymphoblastoid Jurkat cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 5% FBS (Sigma-Aldrich), 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air. To distinguish Raji cells from Jurkat cells in the conjugates, Raji cells (3.0×10^6 cells/ml) were preincubated with 10 µM CMAC for 20 min at 37°C, washed, and resuspended in RPMI/5% FBS. The cells were then incubated for 20 min in the presence or absence of 4 µg/ml SEE and mixed with an equal number of Jurkat cells (5.0×10^5 cells/well) in a final volume of 50 µl, incubated at 37°C for 15 min, and plated onto poly-L-lysine-coated slides. After incubation for 15 min at 37°C, cells were fixed with formalin, permeabilized or not, blocked with 3% BSA and 100 µg/ml γ-globulin, and stained with the appropriate antibodies. Jurkat CH7C17 cells (21) expressing exogenous TCR-α and TCR-β (Vβ3) chains specific for HA were conjugated to HOM2 cells in the presence of 200 µg/ml HA peptide 307–319 (PKYVKQNTLKLAT), a control inactive peptide (PKYVKQNTLELAT), or 4 µg/ml SEB. For conjugation of primary T cells, freshly isolated T lymphocytes from healthy donors were incubated with SEE-pulsed Raji cells and processed as described for the Jurkat-APC conjugates. The experiments with human cells were done according to the guidelines of the Bioethics Committee of the Spanish Research Council and were approved by the institutional Management Committee of the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

DNA constructs and transfection conditions. The 5′-TCATG-GCCCCGCGAGCGGC-3′ and 5′-GGGAGCTTGCTGTGTCTAA-3′ sequences, which target the sequences surrounding the AUG translation initiation site and the 3′ untranslated region of MAL mRNA, respectively, separated by a short spacer (5′-TTCAAGAGA-3′) from their reverse complement, were cloned under the control of the H1-RNA promoter in the pSUPER DNA vector (40) thereby originating the pMAL-siRNA1 and pMAL-siRNA2 constructs. These plasmids were then modified by insertion of a DNA fragment containing the GFP coding sequence under the control of the CMV immediate-early promoter generating the pMAL-siRNA1/GFP and pMAL-siRNA2/GFP constructs. A similar construct containing a target-recognition sequence corresponding to BENE mRNA, which is not expressed in T cells (41), was used as a control. The DNA constructs expressing the ectodomain and transmembrane region of mouse CD4 fused to Lck (CD4/Lck) (42) or to GFP (CD4ΔCyt-GFP) (43) were gifts from A. Weiss (University of San Francisco, San Francisco, CA) and M.F. Krummel (University of San Francisco, San Francisco, CA), respectively. The CD4/Lck construct was used to generate a LAT/Lck construct by excising the CD4 sequences and substituting them by the LAT sequences encoding the first 36 aa of the amino terminus of LAT, which included its extracellular and transmembrane domains. Sequences encoding the c-Myc tag were finally added to the LAT/Lck coding sequence. The plasmid expressing p75-GFP in pEGFP-N1 (44) was a gift from E. Rodriguez-Boulan (Cornell University, Ithaca, NY). The Fyn-GFP construct (45) and the Lck₁₀-GFP construct expressing the first 10-aa sequence of Lck fused to the amino terminus of GFP (46) were generously provided by N. Yamaguchi (Chiba University, Chiba, Japan) and W. Rodgers (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK), respectively. The DNA constructs expressing GFP or Cherry appended to the carboxyl terminus of Lck (Lck-GFP and Lck-Cherry) or the amino terminus of MAL (GFP-MAL and Cherry-MAL) were made by standard techniques. Jurkat cells and primary human T cells were transfected by electroporation using the Gene Pulser system (Bio-Rad Laboratories). As controls of the siRNA experiments, we used Jurkat cells stably expressing N-terminal Myc-tagged MAL proteins with either an intact (RWKSS, MAL/myc) or a modified (RWSSS, MALmut/myc) MAL carboxyl terminus encoded by mRNAs that do not fully pair with the MAL siRNA used (20).

Generation, characterization, and reconstitution of a Jurkat cell mutant defective in MAL expression. The JTIM cell line was generated by chemical mutagenesis using methanesulfonic acid ethyl ester (EMS; Sigma-Aldrich) and selection for clones that were defective in TCR-induced signaling in a manner that is similar to that previously described for PMA-induced up-regulation (19). The deficiency in MAL was identified by a comparison of genes expressed in parental Jurkat and JTIM using DNA microarrays, as described for other mutant Jurkat cell lines (18). JTIM cells were provided by A. Weiss (University of San Francisco, San Francisco, CA). Sometimes the JTIM cells were suddenly able to recover MAL expression spontaneously in a manner that could not be controlled. This probably involves changes in the methylation state of the MAL gene because treatment with the demethylating agent 5-aza-2′-deoxycytidine is able to recover MAL gene expression in these cells (unpublished data) as well as in certain tumor cells in which the MAL gene is silent (47). To circumvent this problem, the absence of MAL expression was checked in parallel by immunoblotting to validate all the experiments done with JTIM cells.

To reconstitute expression with exogenous MAL, JTIM cells were transfected with a pCR3.1 DNA construct (Invitrogen) containing a 0.8-kb EcoRI-XhoI MAL cDNA fragment, which encompasses the 5′ untranslated region, the entire MAL coding region, and part of the 3′ untranslated sequences of MAL mRNA. After selection with 1 mg/ml G-418 sulfate for at least 6 wk after transfection, drug-resistant cell clones were screened for MAL expression by immunoblot analysis with anti-MAL mAb 6D9. All the reconstituted clones that were obtained expressed MAL at similar levels. The cell clones positive for MAL expression were thereafter maintained in drug-free medium. Although all the results presented in this contribution were obtained using the same JTIM/MAL cell clone, two other reconstituted clones were analyzed to confirm our main findings. Jurkat cells stably expressing MAL/myc, MALmut/myc, or GFP-MAL were generated according to a similar protocol.

Flow cytometry. For analysis of CD69 up-regulation, Jurkat cells and JTIM cells were transfected with pEGFP and, in the case of JTIM cells, cotransfected or not with the chimeras expressing CD4/Lck or LAT/Lck. After 24 h, cells were stimulated or not with 10 µg/ml of anti-CD3 antibodies or 50 ng/ml PMA. The GFP-expressing cell population was analyzed 16 h later for the expression of surface CD69 with fluorescent anti-CD69 antibodies (Invitrogen) in a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest Pro software (BD). For analysis of Erk phosphorylation, normal Jurkat cells and JTIM cells were transfected with CD4ΔCyt-GFP and, in the case of JTIM cells, cotransfected or not with the chimeras expressing CD4/Lck or LAT/Lck. After 24 h, cells were stimulated or not with anti-CD3 antibodies or PMA for 15 min and then were fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized with methanol at −20°C. Phosphorylated Erk was analyzed in the cell population expressing CD4ΔCyt-GFP using anti-phospho-Erk rabbit antibodies (Cell Signaling Technology) and a secondary fluorescent anti-rabbit Ig antibody. The use of CD4ΔCyt-GFP facilitates the identification of the transfected cell population as the fluorescence of this transmembrane chimera is retained in fixed permeabilized cells to a greater extent than using just GFP. The cotransfection efficiency was >80% as determined by immunofluorescence microscopy. The mean fluorescence intensity obtained in each case for CD69 or phospho-Erk was compared with that obtained for normal Jurkat cells stimulated with anti-CD3 antibodies, which was taken as 100%. Controls to assess the specificity of the labeling included incubations with control primary antibodies or omission of the primary antibodies.

Luciferase reporter assays. Jurkat cells were transiently transfected using Lipofectamine (Promega) with plasmid DNA (150 ng/1.0 × 10⁶ cells) containing the firefly luciferase gene under the control of IL-2 promoter, AP-1, NF-κB, or NFAT responsive elements and with a renilla luciferase reporter plasmid (Promega). Jurkat cells were then conjugated with Raji B cells in the presence or absence of SEE for 4 h or activated with anti-CD3 antibodies or with 20 ng/ml PMA plus 5 µM ionomycin for 4 h. Aliquots of cell lysates were analyzed for luciferase activity with the Dual Luciferase Reporter Assay kit according to the manufacturer's protocol (Promega). The protein

content in the extracts was determined with a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). All experiments were done three times, each with three replicates. Results are represented as mean \pm SEM of the luciferase activity in stimulated cells relative to that in unstimulated cells.

Detergent extraction procedures, immunoblotting, and immunoprecipitation analyses. Jurkat cells (5.0×10^7 cells) were lysed for 15 min in 25 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, and 0.2% Triton X-100 at 4°C in the presence of phosphatase and protease inhibitors. The extract was brought to 40% sucrose (wt/wt) and placed at the bottom of two sequential layers of 30 and 5% sucrose. Gradients were centrifuged to equilibrium, and the soluble and low-density insoluble fractions were harvested (48). Equivalent aliquots from the soluble and insoluble fractions were subjected to SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). After blocking with 5% nonfat dry milk and 0.05% Tween-20 in PBS, blots were incubated with the appropriate antibodies for 1 h. After several washings, blots were incubated for 30 min with secondary antibodies coupled to HRP and developed using a commercial kit (GE Healthcare). For immunoprecipitation studies, cells were lysed in 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and a cocktail of phosphatase and protease inhibitors. The lysates were precleared for 1 h at 4°C with protein G-Sepharose, centrifuged, and the supernatant was incubated with the indicated specific antibodies for 1 h at 4°C. After incubation with protein G-Sepharose for 1 h, the immunoprecipitates were collected by centrifugation, washed six times, and analyzed by immunoblotting with the appropriate antibodies.

Immunofluorescence and time-lapse confocal microscopic analyses. Cells were fixed in formalin for 20 min, rinsed, and treated with 10 mM glycine in PBS for 5 min to quench the aldehyde groups. Cells were then washed, permeabilized or not with 0.2% Triton X-100 in PBS at 4°C for 5 min, rinsed, incubated with 3% (wt/vol) BSA for 15 min, and incubated with the primary antibody. After 1 h at room temperature, cells were washed and incubated with the appropriate fluorescent secondary antibody. For double-labeling experiments, the same procedure was repeated for the second primary antibody. In the cases where two different mouse mAbs were used, the analysis was done using compatible fluorochrome-labeled isotype-specific secondary antibodies. Controls to assess the specificity of the labeling included incubations with control primary antibodies and omission of the primary antibodies. Images were obtained using a confocal laser microscope (Meta LSM 510; Carl Zeiss, Inc.). For the quantitative analysis of Lck distribution, the Lck fluorescence signal was profiled along a line at the equatorial plane of the cell using the Image J program (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). The ratio of internal to plasma membrane fluorescence was calculated for each type of Jurkat cell in three independent experiments ($n = 20$ cells of each type). Cells with a ratio greater than or equal to the mean number of normal Jurkat cells + $1.5 \times$ SEM were considered to express low levels of Lck at the plasma membrane. Only 5% of WT Jurkat cells met this criterion. For single-color time-lapse confocal fluorescence microscopy, normal Jurkat cells, JTIM cells, or JTIM/MAL were transfected with Lck-GFP, p75-GFP, or Fyn-GFP. For dual-color time-lapse microscopy, normal Jurkat cells stably expressing GFP-MAL or Cherry-MAL were used for the expression of Cherry (Lck) or GFP (p75, Fyn) constructs, respectively. 24 h after transfection, cells were plated onto fibronectin-coated chambers and maintained at 37°C. Images were captured every 15 s using a confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss, Inc.) equipped with a 63 \times lens with a 1.4 NA oil immersion objective and transferred to a computer workstation running MetaMorph imaging software (MDS Analytical Technologies). For deconvolution we used Huygens 3.0 software (Scientific Volume Imaging), and colocalization graphics were produced with Image J. Videos are displayed at three frames/second.

Online supplemental material. Fig. S1 shows a characterization of the Jurkat cell variant deficient in MAL expression. Fig. S2 shows that MAL is required for translocation of ZAP-70 and LAT to IS. Fig. S3 shows a pulse-chase analysis analyzing the incorporation of Lck to detergent-insoluble or

total membrane fractions. Video 1 shows time-lapse microscopy showing MAL and Lck in the same transport carriers destined for the plasma membrane. Videos 2–4 show time-lapse microscopy of Lck in Jurkat, JTIM, and JTIM/MAL cells, respectively. Videos 5 and 6 show time-lapse microscopy of p75 and Fyn, respectively, in JTIM cells. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20080552/DC1>.

We thank A. Weiss, M. Tomlinson, and T. Finco for providing the JTIM cell variant and helpful comments. We thank S. Gómez and A. Jiménez for technical help and Max Diehn and Pat Brown (Stanford University) for help with microarray analysis in the initial studies of JTIM cells. The expert technical advice of C.C. Combs and D. Malide of the Light Microscopy Facility of the National Institutes of Health (Bethesda, Maryland) on the time-lapse experiments and image processing and of C. Sánchez, T. Villalba, and V. Labrador of the Optical and Confocal Microscopy Unit of the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" are also acknowledged. We are grateful to F. Sánchez-Madrid, B. Alarcón, and F. Martín-Belmonte for their helpful advice and sharing of materials throughout this study.

This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (BFU2006-01925 to M.A. Alonso) and from the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI; to R. Puertollano). An institutional grant from the Fundación Ramón Areces to Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" is also acknowledged.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 14 March 2008

Accepted: 31 October 2008

REFERENCES

- Lin, J., and A. Weiss. 2001. T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* 114:243–244.
- Karnitz, L., S.L. Sutor, T. Torigoe, J.C. Reed, M.P. Bell, D.J. McKean, P.J. Leibson, and R.T. Abraham. 1992. Effects of p56lck deficiency on the growth and cytolytic effector function of an interleukin-2-dependent cytotoxic T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* 12:4521–4530.
- Straus, D.B., and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the Lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585–593.
- Ley, S.C., M. Marsh, C.R. Bebbington, K. Proudfoot, and P. Jordan. 1994. Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 125:639–649.
- Shenoy-Scaria, A.M., L.K. Gauen, J. Kwong, A.S. Shaw, and D.M. Lublin. 1993. Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13:6385–6392.
- Bijlmakers, M.-J.J.E., and M. Marsh. 1999. Trafficking of an acylated cytosolic protein: newly synthesized p56^{lck} travels to the plasma membrane via the exocytic pathway. *J. Cell Biol.* 145:457–468.
- Kabouridis, P.S., A.I. Magee, and S.C. Ley. 1997. S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* 16:4983–4998.
- Simons, K., and A. Wandinger-Ness. 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62:207–210.
- Sanchez-Pulido, L., F. Martín-Belmonte, A. Valencia, and M.A. Alonso. 2002. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.* 27:599–601.
- Alonso, M.A., and S.M. Weissman. 1987. cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1997–2001.
- Millán, J., and M.A. Alonso. 1998. MAL, a novel integral membrane protein of human T lymphocytes, associates with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Src-like tyrosine kinases. *Eur. J. Immunol.* 28:3675–3684.
- Puertollano, R., F. Martín-Belmonte, J. Millán, M.C. de Marco, J.P. Albar, L. Kremer, and M.A. Alonso. 1999. The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 145:141–151.
- Cheong, K.H., D. Zacchetti, E.E. Schneeberger, and K. Simons. 1999. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6241–6248.

14. Martin-Belmonte, F., R. Puertollano, J. Millan, and M.A. Alonso. 2000. The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and Fischer rat thyroid cell lines. *Mol. Biol. Cell.* 11:2033–2045.
15. Alonso, M.A., and J. Millán. 2001. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 114:3957–3965.
16. Huppa, J.B., and M.M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3:973–983.
17. Abraham, R.T., and A. Weiss. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4:301–308.
18. Roose, J.P., M. Diehn, M.G. Tomlinson, J. Lin, A.A. Alizadeh, D. Botstein, P.O. Brown, and A. Weiss. 2003. T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol.* 1:E53.
19. Roose, J.P., M. Mollenauer, V.A. Gupta, J. Stone, and A. Weiss. 2005. A diacylglycerol-protein kinase C-RasGRP1 pathway directs Ras activation upon antigen receptor stimulation of T cells. *Mol. Cell. Biol.* 25:4426–4441.
20. Puertollano, R., J.A. Martinez-Menarguez, A. Batista, J. Ballesta, and M.A. Alonso. 2001. An intact dilysine-like motif in the carboxyl terminus of MAL is required for normal apical transport of the influenza virus hemagglutinin cargo protein in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell.* 12:1869–1883.
21. Hewitt, C.R., J. Lamb, J. Hayball, M. Hill, M. Owen, and R. O'Hehir. 1992. Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 175:1493–1499.
22. Bolte, S., and F.P. Cordelières. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224:213–232.
23. Martin-Belmonte, F., P. Arvan, and M.A. Alonso. 2001. MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 276:49337–49342.
24. Millan, J., M.C. Montoya, D. Sancho, F. Sanchez-Madrid, and M.A. Alonso. 2002. Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function. *Blood.* 99:978–984.
25. Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115:377–388.
26. Hancock, J.F. 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:456–462.
27. Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* 47:1597–1598.
28. Montixi, C., C. Langlet, A.-M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M.A. Wurbel, J.P. Chauvin, M. Pierres, and H.T. He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17:5334–5348.
29. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* 8:723–732.
30. Billadeau, D.D., J.C. Nolz, and T.S. Gomez. 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 7:131–143.
31. Sancho, D., M. Vicente-Manzanares, M. Mittelbrunn, M.C. Montoya, M. Gordón-Alonso, J.M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid. 2002. Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol. Rev.* 189:84–97.
32. Ehrlich, L.I.R., P.J.R. Ebert, M.F. Krummel, A. Weiss, and M.M. Davis. 2002. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity.* 17:809–822.
33. Bonello, G., N. Blanchard, M.C. Montoya, E. Aguado, C. Langlet, H.-T. He, S. Nunez-Cruz, M. Malissen, F. Sanchez-Madrid, D. Olive, et al. 2004. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J. Cell Sci.* 117:1009–1016.
34. Das, V., B. Nal, A. Dujancourt, M.-I. Thoulouze, T. Galli, P. Roux, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2004. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse: involvement of SNARE complexes. *Immunity.* 20:577–588.
35. Serrador, J.M., M. Vicente-Manzanares, J. Calvo, O. Barreiro, M.C. Montoya, R. Schwartz-Albiez, H. Furthmayr, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. 2002. A novel serine-rich motif in the Intercellular Adhesion Molecule 3 is critical for its Ezrin/Radixin/Moesin-directed subcellular targeting. *J. Biol. Chem.* 277:10400–10409.
36. Morgan, M.M., C.M. Labno, G.A. Van Seventer, M.F. Denny, D.B. Straus, and J.K. Burkhardt. 2001. Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *J. Immunol.* 167:5708–5718.
37. Lowin-Kropf, B., V.S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* 140:861–871.
38. Schaeren-Wiemers, N., A. Bonnet, M. Erb, B. Erne, U. Bartsch, F. Kern, N. Mantel, D. Sherman, and U. Suter. 2004. The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon-glia interactions in the central nervous system. *J. Cell Biol.* 166:731–742.
39. Rodriguez-Boulant, E., G. Kreitzer, and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:233–247.
40. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296:550–553.
41. del Carmen de Marco, M., L. Kremer, J.P. Albar, J.A. Martínez-Menárguez, J. Ballesta, M.A. García-López, M. Marazuela, R. Puertollano, and M.A. Alonso. 2001. BENE, a novel raft-associated protein of the MAL proteolipid family, interacts with caveolin-1 in human endothelial-like ECV304 cells. *J. Biol. Chem.* 276:23009–23017.
42. Xu, H., and D.R. Littman. 1993. A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell.* 74:633–643.
43. Krummel, M.F., M.D. Sjaastad, C. Wulfig, and M.M. Davis. 2000. Differential clustering of CD4 and CD3z during T cell recognition. *Science.* 289:1349–1352.
44. Kreitzer, G., A. Marmorstein, P. Okamoto, R. Vallee, and E. Rodriguez-Boulant. 2000. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat. Cell Biol.* 2:125–127.
45. Kasahara, K., Y. Nakayama, I. Sato, K. Ikeda, M. Hoshino, T. Endo, and N. Yamaguchi. 2007. Role of Src-family kinases in formation and trafficking of macropinosomes. *J. Cell. Physiol.* 211:220–232.
46. Van Komen, J.S., S. Mishra, J. Byrum, G.R. Chichili, J.C. Yaciuk, A.D. Farris, and W. Rodgers. 2007. Early and dynamic polarization of T cell membrane rafts and constituents prior to TCR stop signals. *J. Immunol.* 179:6845–6855.
47. Lind, G.E., T. Ahlquist, and R.A. Lothe. 2007. DNA hypermethylation of MAL: a promising diagnostic biomarker for colorectal tumors. *Gastroenterology.* 132:1631–1632.
48. Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533–544.